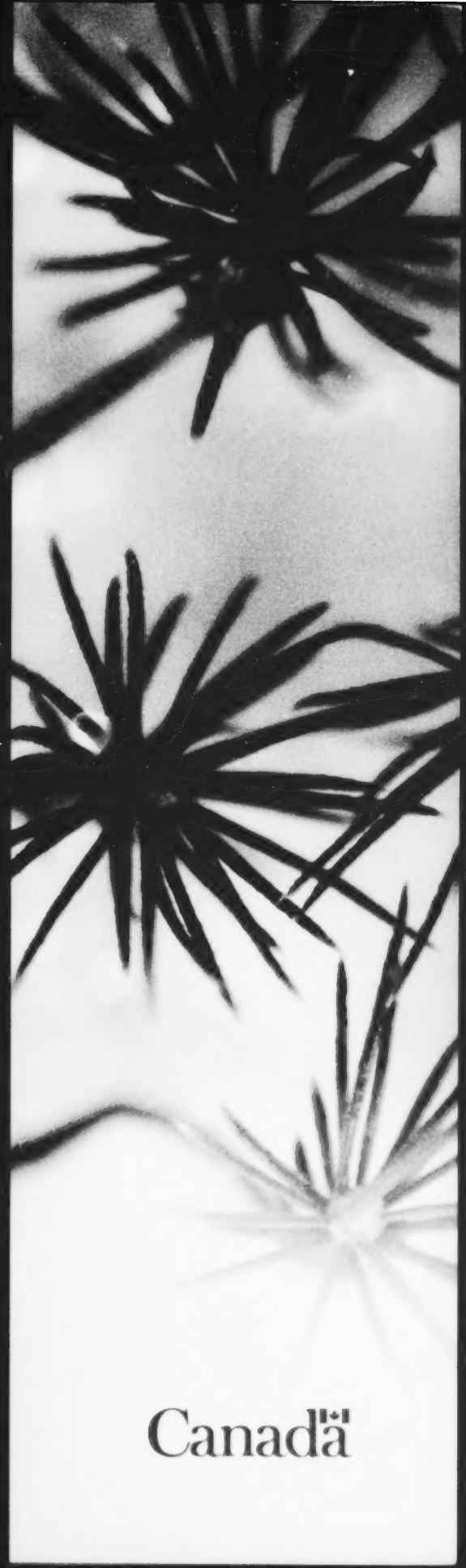
LA GÉNOMIQUE

AU SERVICE DES FORÊTS DE DEMAIN

PREMIER SYMPOSIUM CANADIEN SUR LA GÉNOMIQUE FORESTIÈRE

Rapport du symposium

Sous la direction de
Anne-Christine Bonfils
et Isabelle Gamache



Ressources naturelles Canada
Service canadien des forêts

Natural Resources Canada
Canadian Forest Service

Canada

106-07215/

LA GÉNOMIQUE

AU SERVICE DES FORÊTS DE DEMAIN

PREMIER SYMPOSIUM CANADIEN SUR LA GÉNOMIQUE FORESTIÈRE

Les 2 et 3 septembre 2004
Ottawa (Ontario), Canada

Rapport du symposium

Sous la direction de
Anne-Christine Bonfils
et Isabelle Gamache

Publié par
Ressources naturelles Canada
Service canadien des forêts
Direction des sciences et des programmes
Ottawa

© Sa Majesté la Reine du Chef du Canada, 2006
ISBN 0-662-72184-5
N° de cat. Fo94-8/2006F

Pour obtenir gratuitement des exemplaires de cette publication, prière de s'adresser à :

Ressources naturelles Canada
Service canadien des forêts
580, rue Booth
Ottawa (Ontario) K1A 0E4
Téléphone : 613-947-7341

Pour acheter une version sur microfiche ou des photocopies de cette publication, prière de s'adresser à :

Micromedia Proquest
20, rue Victoria
Toronto (Ontario)
M5C 2N8
Téléphone : 416-362-5211, 1-800-387-2689
Fax : 416-362-6161

This publication is available in English under the title: *Genomics for Future Forests. First Canadian Forest Genomics Symposium.*

Révision : Denis Rochon
Production : Catherine Carmody et Serge Guillemette
Assistance à l'édition : Francine Bérubé
Design graphique : Serge Guillemette

Photographies : Couverture : *à gauche*, empreinte génétique, fournie gracieusement par Nathalie Isabel, Centre de foresterie des Laurentides (CFL), Service canadien des forêts (SCF), Québec; *à droite*, plantules somatiques d'épinette blanche dans une boîte de Pétri, photo de Roberta Gal, SCF, Ottawa. Pages intercalaires : *à gauche*, pages 15, 35, 51, 63, et 71, même source que la couverture (empreinte génétique); *à droite*, page 15, cellules embryonnaires d'épinette blanche transformées par une protéine fluorescente verte, fournie gracieusement par Armand Séguin, CFL; page 35, larve de diprion sur un sapin, photo de Dion Manastyrski, fournie gracieusement par le Centre de foresterie du Pacifique (CFP), SCF, Victoria (Colombie-Britannique); page 51, basidiocarpes du champignon lignivore *Chondrostereum purpureum*, fournie gracieusement par Simon F. Shamoun, CFP; pages 63 et 71, même source que la couverture (plantules). Page 84 : même source que la couverture (plantules).

Catalogage avant publication de Bibliothèque et Archives Canada

Symposium canadien sur la génomique forestière (1er : 2006 : Ottawa, Ont.)

La génomique au service des forêts de demain : Premier symposium canadien sur la génomique forestière : rapport du symposium / Sous la direction de Anne-Christine Bonfils et Isabelle Gamache.

Publ. aussi en anglais sous le titre : Genomics for Future Forests, First Canadian Forest Genomics Symposium.

"Les 2 et 3 septembre 2004, Ottawa (Ontario), Canada". Comprend des réf. bibliogr.

Aussi disponible dans Internet.

ISBN 0-662-72184-5
N° de cat.: Fo94-8/2006F

1. Génomique forestière—Canada—Congrès.
2. Arbres—Maladies et fléaux—Congrès.
3. Génomique forestière—Congrès.
I. Gamache, Isabelle, 1972-
II. Bonfils, Anne-Christine
III. Service canadien des forêts. Direction des sciences et des programmes
IV. Titre.
V. Titre: Premier symposium canadien sur la génomique forestière.

SD399.5.C3614 2006 572.8'6 C2006-980174-6

Imprimé sur du papier recyclé

Imprimé au Canada

Imprimé sur du papier alcalin permanent

Table des matières

Remerciements 5

Avant-propos 7

Introduction 9

Discours de bienvenue 11
Brian Emmett, Service canadien des forêts
Martin Godbout, Génome Canada

Préparer le terrain 13
Geoff Munro

Génomique des arbres

Participation canadienne aux projets de recherche internationaux de génomique forestière 17
Présentation liminaire | Brian Ellis

Génomique fonctionnelle de la régulation dans les arbres forestiers 21
John MacKay

Amélioration génétique des arbres et interactions génomiques dans le contexte des ravageurs forestiers 25
Armand Séguin

Génomique et fonctions des défenses induites par les insectes chez l'épinette et le peuplier 29
Jörg Bohlmann

Faire le pont entre la génomique structurale et la génomique fonctionnelle chez l'épinette 31
Bob Rutledge

Approche protéomique pour étudier les interactions arbre forestier–pathogène 33
Abul K.M. Ekramoddoullah

Génomique des insectes ravageurs et des agents entomopathogènes

Apport de la recherche canadienne aux projets internationaux sur les insectes ravageurs et les agents entomopathogènes 39
Présentation liminaire | Peter Krell

Génomique de la tordeuse des bourgeons de l'épinette et de ses virus pathogènes, et recherche de molécules bioactives dérivées 43
Basil Arif

Recherche de sites cibles pour la lutte contre les insectes 47
Michel Cusson

Génomique fonctionnelle du nucléopolyhédrovirus du diprion 51
Christopher J. Lucarotti

Génomique des champignons

Approches génomiques servant à l'identification d'enzymes fongiques utiles à l'industrie forestière 55
Adrian Tsang

Génomique structurale et fonctionnelle des champignons de la maladie hollandaise de l'orme 59
Louis Bernier

Génomique pour le diagnostic et l'identification de gènes cibles chez les pathogènes des arbres 65
Richard Hamelin

Discussions

Génomique forestière : prioritiés futures et questions d'intérêt public 69

Glossaire de termes choisis 77

Collaborateurs 79

Remerciements

Nous adressons nos remerciements à Basil Arif, Errol Caldwell, Abul Ekramoddoullah, Qili Feng, Richard Hamelin, Gary Hogan, Bruce Pendrel, Ariane Plourde, Robert Rutledge et Armand Séguin, scientifiques et gestionnaires de la recherche du Service canadien des forêts (SCF) ainsi que Catherine Armour, directrice de programme, et Anie Perrault, vice-présidente, Communications, de Génome Canada, de leurs suggestions utiles lors de la planification et de l'élaboration du symposium *La Génomique au service des forêts de demain*.

Nous remercions les conférenciers du symposium pour les exposés passionnants et de grande qualité qu'ils ont préparés et présentés, les présidents des séances, soit Ariane Plourde et Errol Caldwell du SCF, Roger Foxall de Genome BC et Cecil Yip de l'Institut de génomique de l'Ontario, qui ont su nous faire respecter les délais et nous divertir, ainsi que tous les participants pour les discussions fécondes et stimulantes lors des deux séances de dialogue. Nous espérons qu'ils continueront de participer aux futures discussions.

Nous sommes très reconnaissants à tous ceux et celles qui ont veillé au bon déroulement du symposium. Diane Orr et Pina Vieira du SCF ont fourni le soutien logistique essentiel; Danielle Monette a conçu le site Web du symposium; Sandra Abi-Aad s'est occupée du matériel audiovisuel et de la conception et de la préparation de la documentation pour les participants, et Bette Reid lui a prêté main-forte pour le formatage; et Jennifer Goostrey a enregistré les exposés sur bande magnétique audio. Tina Grznar de Génome Canada s'est occupée de la distribution du matériel publicitaire. Lyle Makosky d'InterQuest Consulting a agit comme facilitateur lors des séances de discussion et a préparé des notes récapitulatives.

Isabelle Côté du SCF a assuré la transcription des enregistrements des exposés, et George Tombs est le rédacteur professionnel qui a vérifié les transcriptions et s'est assuré de leur intégralité et de leur exactitude. Enfin, nous remercions le personnel de l'Unité des publications scientifiques et techniques du SCF pour son savoir-faire et son dévouement lors de la préparation de la présente publication : Catherine Carmody pour son apport professionnel et intellectuel à chacune des étapes de l'élaboration de la publication, Denis Rochon pour la révision de la version française, Serge Guillemette pour la conception graphique et Francine Bérubé pour son aide à l'édition du document.

Ce premier symposium canadien sur la génomique forestière a pu se tenir grâce au dévouement du SCF et au financement fourni par l'Initiative fédérale de R-D en génomique.

Avant-propos

En 2004, la recherche en génomique est arrivée à un tournant important de son histoire au Canada. Le programme fédéral de soutien de la recherche était sur le point d'atteindre la fin de sa première phase, et on s'affairait à préparer les demandes de renouvellement, en tenant compte du rendement passé et des priorités futures. Le moment était donc propice à la présentation du premier symposium canadien de génomique forestière par le Service canadien des forêts de Ressources naturelles Canada et Génome Canada. Sur le thème de la « Génomique au service des forêts de demain », le symposium s'est déroulé les 2 et 3 septembre 2004 à Ottawa. Il avait deux grands objectifs :

- présenter les grandes réalisations de la recherche canadienne en génomique forestière, par grand axe stratégique, aux chercheurs et aux décideurs du secteur des forêts et de la biotechnologie;
- permettre des discussions entre les divers intervenants sur l'orientation à donner à la future recherche stratégique dans ce domaine afin de fournir un maximum d'avantages à la population canadienne.

Le Symposium canadien de génomique forestière a profité de l'élan formidable donné par le Deuxième atelier canadien sur la génomique des plantes qui s'est tenu du 29 août au 1er septembre 2004. Organisé par l'Université Laval de Québec, cet atelier a réuni des conférenciers de renommée internationale, spécialisés en génomique végétale, et des chefs de file canadiens de la recherche en génomique. Le Symposium de génomique forestière a toutefois opté pour une approche plus généraliste que l'atelier dans le but de rejoindre également un public non spécialiste.

Le symposium a attiré beaucoup de monde : il a réuni plus de 70 participants de 12 ministères et organismes fédéraux, de neuf universités, de deux instituts de recherche forestière, de deux ministères provinciaux des forêts, de deux associations forestières nationales et d'une société de biotechnologie forestière. Les participants qui ont rempli le formulaire d'évaluation du symposium se sont dits fort satisfaits. Ils ont apprécié l'excellente qualité des exposés et trouvé les séances de discussions particulièrement utiles. Aspect peut-être le plus important, les chercheurs canadiens en génomique forestière ont profité de l'occasion pour renforcer des partenariats, explorer de nouveaux horizons et regrouper de manière stratégique des programmes pour lesquels des demandes de subvention seront présentées au gouvernement fédéral par le biais de Génome Canada et du Service canadien des forêts.

Cette publication se veut un compte rendu du symposium et vise à sensibiliser un plus large auditoire aux activités de recherche en génomique forestière menées au Canada. Nous espérons vous communiquer à vous, chers lecteurs, l'enthousiasme manifesté par les collaborateurs au symposium à l'égard de leurs recherches.

Anne-Christine Bonfils
Présidente, Génomique au service des forêts de demain

Introduction

La génomique forestière ouvre tout un monde de nouvelles possibilités porteuses d'approches novatrices dans le contexte de l'aménagement intensif responsable des forêts et des plantations à rendement élevé dans certaines régions. Nos connaissances de base en génétique progressent à pas de géant concernant les systèmes clés comme la formation du bois, les mécanismes de résistance aux organismes nuisibles et la coévolution d'organismes en interaction. Nous pouvons maintenant envisager des applications novatrices dans les forêts du Canada, comme cultiver des arbres dotés de caractères recherchés en matière de croissance et de qualité du bois et mettre au point des outils de détection rapide, de diagnostic et de répression des insectes et des maladies des arbres.

Le financement de la génomique forestière a permis à la recherche canadienne d'atteindre un niveau très concurrentiel, permettant au Canada de se hisser au plus haut niveau de la recherche forestière à l'échelle internationale. De 1999 à 2004, le gouvernement fédéral a investi plus de 11 millions de dollars dans la recherche en génomique forestière, une somme gérée par le Service canadien des forêts (SCF) de Ressources naturelles Canada. Il a également appuyé la création de Génome Canada en février 2000. Il a investi 435 millions de dollars dans cet organisme au cours d'une période de quatre ans, dont plus de 24 millions de dollars dans huit projets novateurs de recherche sur les forêts et l'environnement répartis dans l'ensemble du Canada. Ces fonds ont eu un effet de levier important sur l'infrastructure et les ressources existantes des ministères fédéraux et des partenariats de recherche avec le secteur privé et le milieu universitaire, et dans les gouvernements provinciaux.

Le SCF est à l'avant-garde de plateformes technologiques uniques en matière de culture de tissus d'arbres et d'insectes, de diagnostic moléculaire, de génétique des populations, de produits de lutte biologique, de génie génétique et de génomique fonctionnelle. Ses activités de recherche complètent à merveille celles effectuées dans les universités canadiennes. De plus, grâce à sa capacité de recherche en génomique, le SCF a pu réaliser une synergie fructueuse avec Génome Canada et participer à des grappes multidisciplinaires.

Génome Canada est un organisme sans but lucratif qui se consacre à l'élaboration et à la mise en œuvre d'une stratégie nationale de recherche en génomique et en protéomique au profit des Canadiennes et des Canadiens et vise à faire du Canada un chef de file mondial dans ces domaines. Il est la principale source de financement et d'information liée à la génomique et à la protéomique au Canada. Il a créé cinq centres de génomique au pays (Atlantique, Québec, Ontario, Prairies et Colombie-Britannique).

Cette publication rend compte des exposés présentés lors du premier Symposium canadien de génomique forestière, la Génomique au service des forêts de demain, qui s'est déroulé les 2 et 3 septembre 2004 sous l'égide du SCF et de Génome Canada. Les exposés portaient sur les thèmes suivants :

- Génomique de la formation du bois et de la résistance aux ravageurs des arbres forestiers;
- Génomique fonctionnelle et comparative des arbres forestiers;
- Génomique des insectes ravageurs et des virus pathogènes associés;
- Applications dérivées de molécules bioactives;
- Méthode génomique d'identification d'enzymes fongiques pour l'industrie des pâtes et papiers;
- Génomique des interactions hôte-pathogène;
- Marqueurs moléculaires pour le diagnostic de pathogènes.

Deux conférenciers de marque ont également participé au symposium et ont décrit certaines des contributions importantes des chercheurs canadiens à des programmes internationaux. Le rapport regroupe les exposés sous trois thèmes qui correspondent à leur présentation lors du symposium : la génomique des arbres, la génomique des insectes nuisibles et de leurs virus pathogènes et la génomique des champignons.

Deux séances de discussion se sont déroulées lors du symposium. Elles portaient sur les priorités futures de la recherche en génomique forestière, notamment en ce qui concerne le SCF et Génome Canada, et sur le rôle que peuvent jouer les chercheurs pour répondre aux préoccupations environnementales, éthiques, économiques et sociales liées à la recherche. Un résumé des principaux constats de ces discussions est présenté vers la fin de la publication qui ne fait toutefois pas état de la séance de présentations par affiches.

Discours de bienvenue

Brian Emmett | Sous-ministre adjoint, Service canadien des forêts, Ressources naturelles Canada

Au nom du Service canadien des forêts de Ressources naturelles Canada, permettez-moi de vous souhaiter la bienvenue au premier Symposium canadien de génomique forestière.

Le Service canadien des forêts (SCF) fournit les fondements scientifiques qui permettent aux décideurs, comme les aménagistes et les responsables de l'élaboration des politiques, de prendre des décisions éclairées sur l'aménagement des forêts de notre pays. Cette tâche est particulièrement délicate lorsque les décisions à prendre concernent un domaine exigeant des connaissances hautement spécialisées, comme la génomique.

Le SCF est le plus important organisme canadien œuvrant en biotechnologie forestière. Il a pour mandat d'aménager de manière durable les forêts du Canada. En quelques mots, disons qu'il doit être attentif aux répercussions économiques, environnementales et sociales des décisions prises dans ce secteur. La nécessité d'améliorer continuellement les choses, de repousser les limites, afin que la société puisse prendre des décisions plus éclairées et de portée plus générale est liée à son mandat. La recherche en génomique est un élément clé pour y arriver. Elle permet au Canada de soutenir la concurrence à l'échelle internationale et de fournir à la société des outils de prise de décisions concernant les ressources naturelles.

Ce symposium vous renseignera sur les réalisations importantes en biotechnologie forestière des chercheurs canadiens qui, au cours des 15 dernières années, ont créé une vision et ont été les forces vives de la recherche en génomique au pays. Ces réalisations ont permis au Canada d'assumer un rôle de chef de file et d'élaborer des plateformes technologiques clés — culture tissulaire, embryogenèse somatique, génie génétique et lutte biologique. Sans ces plateformes, nous n'aurions pas pu accomplir des percées aussi formidables dans le domaine de la génomique.

La recherche en génomique nous aide à orienter les utilisations futures de la forêt. Elle peut nous permettre de renforcer notre compétitivité dans l'économie forestière mondiale ainsi que notre capacité de soutenir et d'améliorer la qualité de vie des Canadiennes et des Canadiens, facilitant ainsi l'atteinte de l'objectif de l'aménagement durable. Faire progresser le taux de croissance des arbres et leur résistance aux insectes et aux maladies, améliorer la qualité de la fibre ligneuse et réduire la pression de l'exploitation des forêts, voilà un ensemble d'objectifs avantageux pour tous, non seulement les entreprises mais également la société. Tout un chacun profitera de l'augmentation de la productivité et des possibilités d'emplois, comme de la réduction des impacts sur l'environnement.

La recherche en génomique forestière au Canada a les objectifs suivants :

- promouvoir une meilleure compréhension et une plus grande pratique du développement durable,
- fournir des données scientifiques précises et non biaisées sur les forêts à l'appui d'une prise de décisions judicieuse,
- améliorer la productivité des forêts et le niveau de vie de la population canadienne.

La recherche en génomique est passionnante, mais elle est complexe et donc souvent méconnue. Pour atteindre nos objectifs, nous avons d'importants défis à relever. La perception du public est un problème sous-jacent fondamental de la recherche en génomique. Ce domaine de recherche soulève des craintes : les gens se demandent s'il convient de s'ingérer dans la nature de cette façon. Cette question mérite d'être examinée. Les premières victimes des émeutes déclenchées par la conscription dans la ville de New York durant la guerre de Sécession ont été les nouvelles balayeuses mécaniques qui étaient perçues comme une menace par les travailleurs non qualifiés qui assuraient le nettoiement de la voie publique avant l'avènement de ces machines. Les progrès technologiques ont de tout temps suscité des réactions négatives. Cependant, la question qui nous préoccupe, à savoir ce que nous faisons avec la nature, est un peu différente. Elle est plus d'ordre éthique et témoigne de préoccupations à l'égard de la voie que nous empruntons comme société et êtres humains.

En tant que chercheurs et décideurs, nous devons comprendre que nous n'évoluons pas dans une bulle, isolés du public. La diffusion des résultats de la recherche au sein de la communauté scientifique forestière a ses limites. Nous devons maintenir le dialogue avec le public et l'informer des améliorations scientifiques que nous apportons et des moyens concrets que nous prenons pour aborder les défis stratégiques et les préoccupations qu'elles soulèvent. Tout comme les forestiers ont besoin d'une autorisation pour récolter les arbres, nous avons besoin de l'« aval de la société » pour effectuer notre recherche. Ce n'est qu'à ce moment-là que nous obtiendrons le soutien financier et politique que nous cherchons. Nous devons relever le défi de faire connaître ce que nous faisons et pourquoi nous le faisons. Nous devons expliquer que la recherche en génomique forestière ne répond pas uniquement à des impératifs scientifiques mais également à des impératifs stratégiques qui témoignent des enjeux prioritaires de la politique publique pour les utilisateurs potentiels. Nous devons parler de nos motivations profondes — effectuer des recherches scientifiques pour élargir les choix qui s'offrent à la société et pour contribuer au développement durable. Nous devons explorer les sensibilités politiques et

sociales sous-tendant les préoccupations du public. La population canadienne veut surtout savoir si les applications de la génomique sont sûres. La génomique offre de nombreuses possibilités de recherche passionnantes, nais nous devons garantir aux Canadiennes et aux Canadiens que leur santé et leur sécurité sont nos principales préoccupations.

La sensibilisation du public à la biotechnologie — ses applications et les questions qui l'entourent — fluctue souvent au gré des événements et de la couverture médiatique des découvertes récentes. Quoi qu'il en soit, la recherche sur l'opinion publique montre que la population canadienne apprécie, dans l'ensemble, les bienfaits potentiels de la biotechnologie, notamment en ce qui concerne la santé. Il subsiste toutefois des lacunes en matière d'information ainsi que des préoccupations, notamment à l'égard des grands enjeux éthiques, sociaux et environnementaux. La population canadienne a, en général, confiance dans son système national de réglementation, mais, bien souvent, elle ignore comment il s'applique aux pratiques et services de la biotechnologie. Notre tâche est de combler cette lacune dans les connaissances. Dégageons les idées fausses et transmettons la bonne information sur la génomique de manière à ce qu'elle parvienne à ceux et celles qui ne font pas partie de la communauté scientifique. Pour vérifier si le but est atteint, je me demanderais si je peux l'expliquer à une citoyenne comme ma mère qui est préoccupée par la question. Nous devons établir des liens explicites entre nos objectifs de recherche et les priorités de la politique publique puisque la recherche est financée par l'argent des contribuables. Le milieu de la recherche forestière doit communiquer efficacement l'information aux ministres afin que ces derniers puissent présenter au Cabinet les choix qui s'offrent à eux et les compromis auxquels ils font face. Nous devons toujours être conscients du contexte politique et social dans lequel nous effectuons la recherche en génomique forestière.

Je vous souhaite un symposium des plus réussis et des échanges fructueux.

Martin Godbout | Président et directeur général, Génome Canada

Génome Canada est fier de coparrainer le premier Symposium canadien de génomique forestière avec Ressources naturelles Canada. Nous sommes également enchantés que plus de 80 participants se soient inscrits au symposium. Je vous souhaite la bienvenue.

Lorsque Génome Canada a été créé, il y a quatre ans, personne à Ottawa n'était même capable d'épeler le mot génomique! Et pourtant, aujourd'hui, nous avons quitté nos laboratoires universitaires, industriels et gouvernementaux pour nous réunir et échanger nos idées sur la façon dont nous pouvons former des projets à grande échelle de génomique et de protéomique, capables de soutenir la concurrence à l'échelle internationale. C'est tout un exploit en si peu de temps!

La plupart des Canadiennes et des Canadiens sont au courant des retombées de la génomique sur la santé humaine, mais ils envisagent rarement les applications de cette discipline à l'agriculture, aux forêts, aux pêches et à l'environnement. En fait, les applications de la génomique sont innombrables. Même si les travaux en génomique forestière n'ont débuté que récemment au Canada, ils sont réputés internationalement. Cet état de choses est attribuable non seulement au fait que le Canada possède de vastes forêts, mais également au fait que la génomique était considérée comme offrant des possibilités à exploiter pour améliorer le quotidien de la population canadienne.

La réputation du Canada en génomique est également due dans une large mesure au leadership exercé par des scientifiques d'exception qui souhaitaient comprendre la génétique fondamentale des arbres. Les arbres sont différents des autres organismes que les généticiens avaient plus coutume d'étudier. Ils restent au même endroit pendant toute leur vie. Ils n'ont pas de système immunitaire et pourtant, certains vivent cent ans ou plus sans être anéantis par des insectes ou des pathogènes. Les arbres ont des réactions uniques à la sécheresse et aux éléments nutritifs. Nous ne faisons que commencer à comprendre les fonctions complexes des arbres. Pour accélérer l'amélioration des arbres, il faut bien comprendre le code génétique d'un arbre. Par ailleurs, la population souhaite voir augmenter la superficie des forêts en raison de leurs bienfaits sur l'environnement de la planète et de leurs utilisations récréatives et industrielles. Les forêts sont source d'avantages socioéconomiques pour tous les habitants du Canada. Ces nombreuses motivations donnent toute son importance à ce symposium.

Au cours des deux prochains jours, certains des chefs de file en génomique forestière vous parleront de leurs projets. Génome Canada appuie ces scientifiques. À ce jour, plus de 29 millions de dollars ont été investis dans quatre projets à grande échelle en foresterie au Canada et, par l'entremise de partenaires internationaux, dans d'autres parties du monde. Ainsi, en 2003, des chercheurs canadiens et suédois en foresterie ont entrepris un projet conjoint portant sur les réactions du peuplier, au niveau génétique, aux stress dus à des facteurs abiotiques et à des organismes nuisibles ainsi qu'à l'environnement. L'annonce de ce projet a été faite lors d'un atelier scientifique qui s'est déroulé à Ottawa en présence de Göran Persson, premier ministre de la Suède en visite officielle au Canada, accompagné de Rey Pagtakhan, alors secrétaire d'État (Sciences, recherche et développement). Ce type de collaboration met en évidence l'importance que revêt ce domaine pour de nombreux pays. Notre Symposium GE^{3}LS (Enjeux éthiques, économiques, environnementaux, de droit et de société liés à la génomique) se tiendra également au printemps [2005] et s'intéressera aux enjeux éthiques liés à l'agriculture et à la foresterie. Nous prévoyons participer à un nombre croissant de projets conjoints et de débats à mesure que la génomique prendra de l'ampleur. Nous espérons que ce premier Symposium canadien de génomique forestière et l'annonce récente du Concours III de Génome Canada favoriseront davantage la collaboration et seront une occasion de discuter des bienfaits socioéconomiques que peuvent procurer les projets de recherche qui seront exposés aujourd'hui.

Préparer le terrain

Geoff Munro | Directeur général, Direction des sciences et des programmes, Service canadien des forêts, Ressources naturelles Canada

La plupart des Canadiennes et des Canadiens habitent dans des centres urbains, ce qui n'empêche pas le Canada d'être souvent qualifié de pays de forêts. Le Canada possède 402 millions d'hectares de forêt et autres terrains boisés, dont 46 % sont considérés comme commercialement viables, c'est-à-dire à croissance relativement rapide, produisant des arbres de dimensions suffisantes pour être récoltés et transformés et pouvant être régénérés ou conservés. À l'heure actuelle, seule une petite fraction (0,3 %) de la forêt est récoltée, mais ces activités de récolte sont à la base d'une industrie de 80 milliards de dollars par année et assurent la subsistance d'environ 300 collectivités. Le Canada est un pays de forêts parce que le bien-être économique, social et environnemental de sa population dépend en partie de la forêt.

Au cours des deux cents dernières années, l'exploitation forestière au pays est passée par un certain nombre d'étapes. L'industrie a véritablement pris naissance avec la récolte des pins blancs qui étaient transformés en mâts pour les navires de la Marine royale britannique. À cette époque, les ressources forestières du Canada semblaient inépuisables. Par la suite, lorsqu'il est devenu évident qu'elles ne l'étaient pas, les aménagistes ont adopté une philosophie d'approvisionnement durable et ont tenté de réglementer la superficie et le volume des coupes pour assurer la pérennité des ressources. Au fil du temps, la population a commencé non seulement à voir les forêts comme une source de bois mais également à les apprécier pour une gamme d'autres valeurs, y compris leur valeur esthétique. Ces valeurs étaient alors considérées comme un obstacle à la récolte. Cette attitude a récemment évolué pour faire place à une approche dite d'aménagement durable des forêts — un aménagement qui favorise le développement économique et le bien-être social des générations actuelles et futures de Canadiens, sans outrepasser la résilience des écosystèmes forestiers.

Le Canada a plusieurs grands défis à relever en matière d'aménagement forestier. En premier lieu, il doit engendrer les mêmes avantages économiques sur une superficie toujours plus restreinte (essentiellement, produire beaucoup de bois sur peu de terres), comme le réclame le public. Ainsi, en Ontario, les préoccupations grandissantes du public à l'égard de la conservation des terres dans leur état naturel ont débouché sur le processus « Des terres pour la vie » de la fin des années 1990 qui a abouti à la création d'une série de parcs et d'aires protégées. En deuxième lieu, le Canada doit gérer les effets de conditions climatiques plus extrêmes ou en évolution sur les forêts du pays. En dernier lieu, il doit trouver des solutions novatrices, par le biais d'initiatives comme la Stratégie d'innovation du Canada, afin d'accroître de façon générale la productivité des forêts.

La recherche en biotechnologie forestière, et notamment en génomique, peut contribuer à trouver des moyens de continuer à gérer de façon durable les forêts du Canada tout en tenant compte des défis susmentionnés. Diverses techniques existantes peuvent être utilisées pour produire des arbres à croissance plus rapide qui procurent un rendement plus élevé en pâte et en bois par unité de superficie, favorisant ainsi un aménagement intensif des forêts. D'autres techniques (par exemple, la phytorestauration des sites contaminés) peuvent tirer parti des connaissances issues des recherches écologiques actuelles sur les processus et la résilience des écosystèmes forestiers pour aider à maintenir ou à rétablir la biodiversité. La biotechnologie forestière peut également permettre de rendre le processus de fabrication de la pâte de bois plus éconergétique et de réduire la nécessité de recourir à des produits chimiques dangereux pour lutter contre les insectes et les maladies des arbres.

Le Service canadien des forêts (SCF) de Ressources naturelles Canada (RNCan) participe activement à un certain nombre d'initiatives « horizontales » clés menées dans le cadre de partenariats inter- et intragouvernementaux et avec des universités, l'industrie, le public et d'autres intervenants. Par exemple, le programme de Forêt 2020 pour la démonstration et l'évaluation de plantations est une initiative dirigée par le SCF visant à explorer la capacité des plantations de feuillus à croissance rapide d'atténuer les effets des changements climatiques. Le Programme de recherche et de développement énergétiques (PRDE) de RNCan étudie les moyens de produire de grandes quantités d'énergie renouvelable peu coûteuse. Par-dessus tout, le SCF joue un rôle de premier plan dans la Stratégie canadienne en matière de biotechnologie (SCB), les forêts constituant un secteur clé de la recherche en biotechnologie. Le programme de biotechnologie du Canada, dont la recherche en génomique est un élément essentiel, tire ses origines de la Stratégie nationale en matière de biotechnologie (SNB) de 1983. Au cours des années qui ont suivi, le gouvernement fédéral a pris différents engagements en matière de biotechnologie. En 1998, à l'issue de vastes consultations sectorielles, la SNB a été renouvelée et est devenue la SCB dont la vision est de « rehausser le niveau de vie des Canadiens — sur le plan de la santé, de la sécurité, de l'environnement et du développement social et économique — et, à cette fin, faire du Canada un chef de file mondial sérieux en matière de biotechnologie ».[1] Un secrétariat permanent et un comité consultatif ont été mis

1. Industrie Canada, Secrétariat de la Stratégie canadienne en matière de biotechnologie. 1998. *La Stratégie canadienne en matière de biotechnologie (1998) : Un processus de renouvellement permanent.* Document en ligne : http://strategis.ic.gc.ca/cbs

sur pied, et un cadre de responsabilisation axé sur les résultats a été élaboré. Au cours des années 1999 et 2000, des investissements majeurs ont été faits dans des initiatives de génomique forestière, et Génome Canada a été créé. La portée des projets en génomique n'a cessé de s'élargir au fil des ans, entraînant une collaboration plus étroite entre le gouvernement, les universités et l'industrie.

Le SCF est le plus important organisme de coordination des politiques et de la recherche forestière à vocation scientifique au pays. Le défi consiste en partie à harmoniser les politiques élaborées par l'administration centrale d'Ottawa avec les activités de recherche menées dans les cinq centres nationaux du SCF. Grâce à ses centres et à divers partenariats, le SCF est à la fine pointe de la recherche en biotechnologie forestière. Au nombre des techniques mises au point pour aborder des enjeux majeurs, comme la régénération et la protection des forêts, figurent des méthodes d'amélioration classique des arbres ou de lutte biologique, des techniques de culture cellulaire et tissulaire et des techniques avancées de biologie moléculaire. Des sommes importantes continuent d'être investies dans l'amélioration des arbres, et les progrès dans ce domaine ont été considérables. La biotechnologie permet de plus en plus au Canada de régénérer et de protéger la forêt, et elle appuie son programme d'aménagement durable. L'actuel Plan stratégique du Service canadien des forêts en matière de biotechnologie a pour objectif de fournir la base de connaissances et les technologies pouvant contribuer à améliorer la productivité des arbres. Pour l'atteindre, le SCF doit tout d'abord s'assurer que les produits dérivés de ces technologies sont sans danger et efficaces et que des règlements et stratégies appropriés de déploiement sont en place. Il doit, en même temps, continuer de favoriser le développement responsable de biotechnologie forestière.

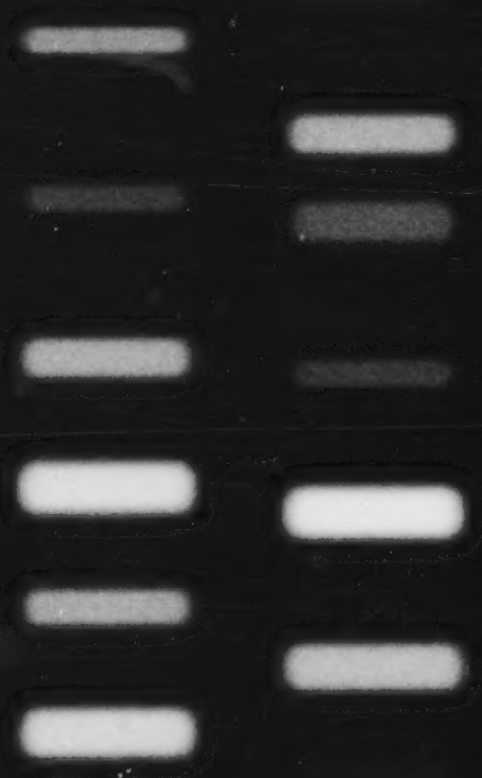
Pour entrer de plain-pied dans l'économie du 21e siècle, le gouvernement fédéral a élaboré un plan général en matière de biotechnologie pour le Canada. Les activités de recherche et de développement du SCF contribuent énormément à l'atteinte des objectifs du gouvernement en matière d'innovation, d'intendance et de commercialisation dans un contexte international, tout en faisant entrer le Canada dans l'ère de la « bioéconomie ». Les sommes investies dans la biotechnologie sont toujours importantes et proviennent principalement du Fonds de la SCB, du financement de Génome Canada et de fonds internes des milieux de la génomique. À l'issue d'un examen récent de la gestion des dépenses du gouvernement en biotechnologie, le Secrétariat du Conseil du Trésor a demandé une coordination plus étroite de la recherche et de l'élaboration des politiques entre les ministères gouvernementaux, les universités et le secteur privé. Le gouvernement examine actuellement le réalignement des dépenses et l'efficacité avec laquelle les résultats de recherche sont transmis à la collectivité dans son ensemble. De plus, l'examen du Conseil du Trésor a mis en évidence des questions interministérielles et de gouvernance et a demandé que soient mieux définies les responsabilités respectives des ministères gouvernementaux.

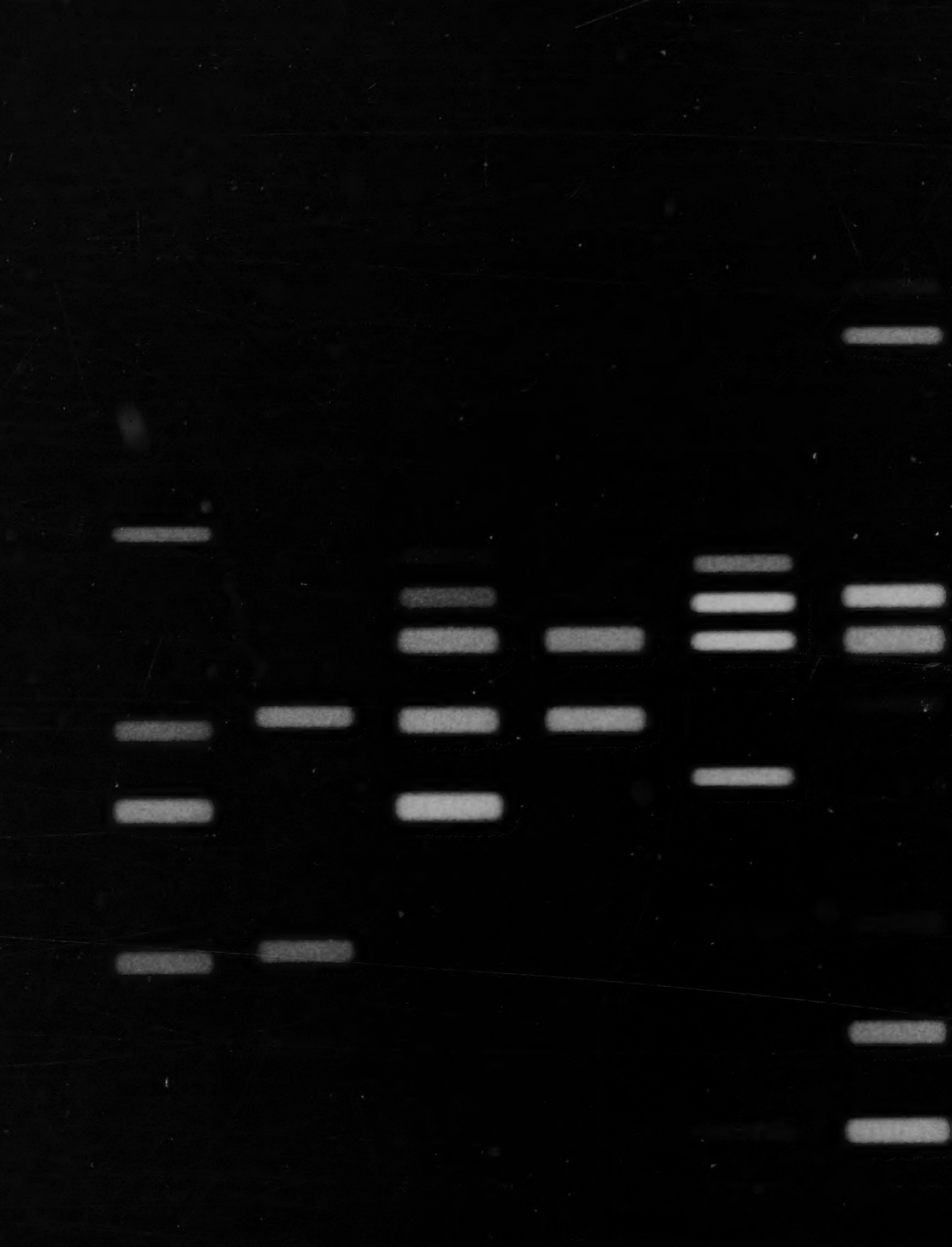
Six ministères/organismes — le Conseil national de recherches du Canada, Agriculture et Agroalimentaire Canada, Santé Canada, Environnement Canada, Pêches et Océans Canada et RNCan — participent au programme fédéral de recherche-développement en génomique et sont régis par un cadre commun de responsabilisation. Chaque étape de ce programme aura une durée de trois ans, et la deuxième sera terminée en 2005. Le SCF a reçu jusqu'à maintenant quelque 11 millions de dollars pour des projets en génomique forestière. Il a mis sur pied une structure de gestion et un processus de concours. Les affectations budgétaires annuelles sont assujetties à des examens périodiques. L'initiative en génomique du SCF est structurée par programme, et les projets sélectionnés doivent porter sur l'un des domaines suivants : les systèmes de production et de protection des arbres forestiers, la mise au point de marqueurs moléculaires pour le diagnostic, la surveillance et la sélection précoce, la production d'arbres génétiquement améliorés ainsi que l'élaboration de méthodes écologiques de protection des forêts.

Selon les résultats d'une analyse multicritères du nombre et de l'impact des publications scientifiques spécialisées qu'a effectuée Science-Metrix, une entreprise spécialisée dans l'évaluation de la science, de la technologie et de l'innovation, le Canada s'est classé au premier rang en matière de génomique forestière entre 1992 et 1997, mais s'est retrouvé derrière la France, la Suède et l'Australie de 2001 à 2003. Il n'est pas encore clair si les autres pays ont simplement rattrapé le Canada ou si la production scientifique du pays a considérablement diminué. Il convient de souligner que le classement de Science-Metrix reposait sur les publications scientifiques produites et non pas sur le nombre d'entreprises de biotechnologie créées ou de produits à l'étape de la commercialisation. D'autres méthodes, peut-être plus pertinentes, permettraient probablement de mieux évaluer la progression de la biotechnologie dans un pays. Cependant, cette évaluation comparative pourrait servir d'avertissement : même si le Canada faisait nettement office de précurseur au début des années 1990 avec sa SNB, il doit maintenant redoubler d'efforts pour conserver son avantage concurrentiel en génomique forestière, un domaine où dominent d'autres pays. Il est également possible de voir dans ce classement une invitation à collaborer avec ces autres acteurs.

Durant ce symposium, on présentera un certain nombre de projets témoignant de l'excellence scientifique de la génomique forestière canadienne. Les réactions qui nous parviendront lors des périodes de discussion contribueront à façonner l'orientation du plan stratégique concernant la génomique et la biotechnologie dans le secteur forestier canadien et le rôle de chef de file du SCF.

GÉNOMIQUE DES ARBRES





Participation canadienne aux projets de recherche internationaux de génomique forestière

Présentation liminaire Brian Ellis | Michael Smith Laboratories, University of British Columbia, Vancouver (Colombie-Britannique)

Je vais aborder dans cette présentation la participation du Canada aux efforts internationaux de recherche en génomique forestière et, en particulier, l'un de ses meilleurs exemples, les travaux effectués sur le génome du peuplier (*Populus*). En premier lieu, je vais explorer brièvement le concept de « génomique verte », c'est-à-dire la génomique des végétaux en général, puis je vais expliquer les raisons pour lesquelles le peuplier a été choisi comme modèle de la génomique des arbres ainsi que l'objet du projet de séquençage du génome du peuplier. Pour terminer, j'examinerai la situation actuelle de la génomique forestière au Canada et ses orientations futures.

Il existe probablement quelque 250 000 espèces de végétaux, d'où l'impossibilité évidente d'étudier le génome de chacune. Certaines ont une plus grande importance économique que d'autres, mais les espèces les plus importantes sur le plan économique ont généralement des génomes trop complexes pour pouvoir être étudiés efficacement. Il est donc essentiel que la génomique des plantes dispose d'une bonne espèce modèle. La première plante modèle choisie pour étudier le génome a été une espèce bien connue, l'*Arabidopsis thaliana*[1]. En 1996, une équipe internationale de chercheurs a été mise sur pied[2] pour séquencer le génome d'*Arabidopsis* qui, en 2000, est devenue la première espèce végétale séquencée. Les génomes végétaux sont extrêmement riches en information, et les scientifiques peuvent donc rarement affirmer avec certitude que le séquençage d'un génome donné est complètement terminé. Quoi qu'il en soit, la collaboration internationale dont a fait l'objet le séquençage du génome d'*Arabidopsis* a permis d'obtenir un produit de grande qualité : 125 millions de paires de base d'information génétique répartie sur cinq chromosomes.

La séquence du génome d'*Arabidopsis* a fourni aux chercheurs une nouvelle ressource de taille et sa disponibilité et sa qualité ont galvanisé la recherche sur les plantes. En utilisant le terme « *Arabidopsis* » pour effectuer une recherche dans les titres, j'ai pu constater que le nombre de communications publiées sur l'*Arabidopsis* avait augmenté régulièrement au cours des 20 dernières années, pour s'accroître encore plus vite depuis le séquençage de son génome en 2000.

Les retombées manifestes du séquençage du génome d'*Arabidopsis* ont stimulé l'intérêt pour un arbre modèle. Il est évident qu'il y a des différences entre l'*Arabidopsis*, une plante herbacée annuelle, et les arbres, de grands végétaux ligneux persistants et d'une grande longévité. De plus, les arbres sont polyphylétiques, c'est-à-dire qu'il s'agit d'un groupe de taxons ne partageant pas tous un ancêtre commun. Les arbres ont habituellement de très grands génomes; ainsi, le génome de n'importe quelle essence de pin est plusieurs fois plus grand que celui du génome humain (environ 27 000 millions de paires de base), qui est lui-même beaucoup plus imposant que celui de l'*Arabidopsis*. En raison de sa taille, le séquençage du génome d'un arbre représente un défi majeur, mais, fort heureusement, la technologie et les méthodes de séquençage deviennent sans cesse plus rapides et moins coûteuses, améliorant ainsi les perspectives de séquençage de génomes plus importants. Quoi qu'il en soit, le séquençage du génome du pin ou de l'épinette reste à faire.

En comparaison de la plupart des autres arbres, le peuplier a toutefois un génome relativement petit (environ 500 millions de paires de base), à la portée de la technologie actuelle de séquençage. De plus, le peuplier est une essence d'importance commerciale, largement répandue et cultivée dans l'hémisphère Nord. Il sert à la production de biomasse dans des plantations à courte révolution et c'est une source de fibre ligneuse et de bois massif. Il se prête bien à l'utilisation de la technologie de la génomique, car il est facile à multiplier in vitro et son ADN peut être transformé pour étudier les effets et le comportement des gènes d'intérêt.

Par conséquent, le département de l'Énergie des États-Unis a récemment décidé de séquencer le génome du peuplier. Un sujet femelle du peuplier de l'Ouest (*Populus trichocarpa*) de l'État du Washington a été sélectionné comme donneur d'ADN. Les extraits d'ADN ont été fournis au Joint Genome Institute (JGI), exploité par la University of California pour le compte du département de l'Énergie. Un consortium international de chercheurs s'intéressant au peuplier et à son nouveau statut d'arbre modèle a été mis sur pied pour collaborer au projet sur le génome du peuplier et réunir des ressources. Je décrirai certaines contributions faites par ces collaborateurs internationaux.

Le JGI a choisi la méthode de séquençage — le séquençage aléatoire du génome complet que je décrirai plus tard — et a fourni la plateforme technologique nécessaire. Les chercheurs du JGI procèdent actuellement à l'assemblage des fragments d'ADN séquencés et à une première annotation des gènes, c'est-à-dire qu'ils attribuent des noms aux gènes identifiés dans la séquence. L'Oak Ridge National Laboratory (ORNL) du Tennessee, qui collabore également avec le département de l'Énergie, a contribué à cartographier ces gènes, dans le cadre du volet d'intégration de la séquence d'ADN comme telle à la carte génétique du peuplier et il a également participé à l'annotation de la séquence du génome.

Le Canada a également participé activement au consortium international, par le biais du projet Treenomix de la University of British Columbia, dont j'étais l'un des quatre chercheurs principaux (en compagnie de mes collègues Carl Douglas, Jörg Bohlmann et Kermit Ritland) ainsi que par le biais du projet Arborea du Québec.

Les projets Treenomix et Arborea ont tous deux été financés par Génome Canada dans le but de stimuler l'application de la

1. *Arabidopsis thaliana*, appelée en français arabette des dames, est une petite angiosperme qui fait partie de la famille des crucifères (Brassicacées).
2. L'*Arabidopsis Genome Initiative* (AGI).

génomique aux ressources forestières canadiennes. L'équipe du projet Treenomix a collaboré avec celle du Michael Smith Genome Sciences Centre (GSC) de Vancouver à la production d'une carte physique du génome du peuplier afin d'aider à l'assemblage de la séquence génomique. Ce faisant, nous avons contribué à créer une ressource en vue de recherches futures — une « banque » de chromosomes artificiels de bactéries (BAC) renfermant de gros fragments de l'ADN du génome du peuplier. Les extrémités des BAC ont été séquencées, et l'« empreinte » de séquence unique de chaque BAC a été prise et utilisée pour définir les chevauchements des différents BAC. Ces BAC chevauchants ont ensuite pu être assemblés pour former un « chemin de recouvrement » qui, conjugué aux séquences des extrémités des BAC, aident à définir la structure physique du génome. L'équipe de Treenomix a également séquencé entièrement les copies d'ADN complémentaire (ADNc) de milliers de gènes du peuplier afin de construire une banque de séquences géniques vérifiées et établies qui ont joué un rôle clé dans les progrès de l'assemblage initial des séquences du génome. Fait intéressant, les fonds octroyés par Génome Canada au projet Treenomix n'étaient pas destinés à financer le séquençage du génome du peuplier, car ces travaux n'avaient pas encore été annoncés. Mais Génome Canada et Genome British Columbia (BC), face à la contribution précieuse et utile que nous pouvions apporter au projet de séquençage, nous ont permis de réaffecter une partie importante de nos fonds pour nous permettre de collaborer à cet effort du département de l'Énergie.

Au total, plus de 250 000 séquences EST (étiquettes de séquences exprimées) (lectures de courtes séquences de clones d'ADNc du peuplier) ont été recueillies dans divers centres. La Suède (Umeå Plant Science Centre) et le Canada ont tous deux contribué énormément à cette activité. En Belgique, l'Université de Gand a utilisé son expertise en bioinformatique pour aider à analyser l'organisation du génome et à l'associer à des jeux de données biologiques.

Le JGI a utilisé la méthode de séquençage aléatoire du génome complet pour séquencer le génome de 485 millions de paires de base du peuplier. Pour résumer, disons que cette méthode consiste à découper l'ADN génomique en fragments de tailles diverses (de relativement petits à beaucoup plus grands), puis à faire faire des lectures de ces fragments choisis au hasard par des séquenceurs. Chaque passage dans un séquenceur fournit environ 500 paires de base de données utilisables. Les fragments sont ensuite éliminés, et le processus est répété à de nombreuses reprises. Chaque parcelle de l'ADN génomique finira par être séquencée à de multiples reprises, mais de manière aléatoire. Ce séquençage aléatoire fournit une somme énorme d'éléments d'information qui doivent être assemblés pour recréer la véritable séquence du génome. Fort heureusement, le JGI dispose de superordinateurs et d'un logiciel d'assemblage capable de comparer tous les petits fragments des séquences d'ADN et de trouver où ils se chevauchent. Des séquences composites plus longues sont ainsi produites (ensemble de fragments contigus d'ADN ou contigs). Un traitement informatique plus poussé permet d'assembler ces contigs en vastes régions génomiques appelées « échafaudages ». Le progiciel JAZZ qu'utilise le JGI a produit plusieurs milliers de tels échafaudages, mais un petit sous-ensemble de ceux-ci se compose d'échafaudages importants qui couvrent pratiquement toutes les régions codantes des gènes. Idéalement, le nombre d'échafaudages devrait être ramené à 19 puisque le peuplier a 19 chromosomes, mais cet objectif sera difficile à atteindre en raison des nombreux segments de séquences répétitives qui ont tendance à déjouer les programmes d'assemblage. Heureusement, la National Science Foundation a récemment alloué à l'ORNL des fonds qui lui permettront de poursuivre ses travaux sur ces échafaudages afin de combler les lacunes et d'améliorer l'assemblage. Cependant, d'après les données produites jusqu'à maintenant, le génome du peuplier se compose d'environ 485 millions de paires de base, et la portion de la séquence assemblée de manière fiable contiendrait, selon les estimations, environ 98 % des régions codantes des gènes et, par conséquent, la majeure partie de l'information biologique pertinente[3].

Nous disposons maintenant de la séquence du génome du peuplier — 485 millions de paires de base — mais qu'en est-il des gènes eux-mêmes? Trois équipes de chercheurs (du JGI, de l'ORNL et de l'Université de Gand) se sont employées parallèlement à identifier et à localiser les gènes encodés dans cette séquence. Cette démarche informatique a identifié provisoirement quelque 45 000 modèles et prédictions de gènes. Les biologistes ont peaufiné l'annotation des gènes prédits lors d'un atelier d'annotation intensif qualifié de « grand rassemblement ». À cette occasion, des experts dans divers domaines de la biologie ont tenté de valider les appels de gènes calculés, en s'appuyant sur leurs connaissances de familles particulières de gènes[4].

Avec ses 45 000 modèles de gènes, le peuplier semble être génétiquement plus riche que l'*Arabidopsis*. Le nombre de gènes du peuplier peut avoir été surestimé, mais il est également possible que le peuplier, au fil de son évolution, en soit venu à utiliser un ensemble de gènes plus élaboré que l'*Arabidopsis*. Étant donné que plus de 90 % des séquences d'ADNc pleine longueur — la lecture des gènes individuels — sont semblables aux gènes correspondants de l'*Arabidopsis*, il est manifeste que le peuplier et l'*Arabidopsis* sont étroitement apparentés, ce qui n'a rien d'étonnant. Le peuplier semble toutefois se distinguer par la duplication de gènes à grande échelle qui s'est produite chez de nombreuses familles de gènes. Il faudra cependant effectuer d'autres recherches biologiques pour déterminer si ces gènes dupliqués contribuent de façon nouvelle et importante au succès du peuplier sur le plan écologique.

Les efforts de séquençage du génome du peuplier ont également débouché sur la mise au point de nouveaux outils de recherche permettant d'étudier les profils d'expression génique. Ainsi, des biopuces ou puces à ADN (supports sur lesquels est fixé une multitude de fragments d'ADN) sont en voie d'élaboration. Pour construire une biopuce, on dépose sur une plaque de verre une collection très dense de copies de molécules individuelles d'ADNc représentant une grande partie de la région codante

3. Le 21 septembre 2004, le JGI a annoncé que l'institut et ses collaborateurs avaient terminé le séquençage du génome du peuplier de l'Ouest.

4. Le grand rassemblement pour l'annotation du génome du peuplier s'est déroulé au JGI en décembre 2004.

du génome. Les puces à ADNc actuelles du peuplier comptent jusqu'à 25 000 gènes sur une seule lame de microscope. De plus, Affymetrix prépare actuellement des biopuces commerciales du peuplier basées sur sa technique brevetée de photolithographie d'oligonucléotides. Ce sont là de puissants outils à la disposition des groupes de chercheurs qui veulent suivre l'expression des gènes de peuplier dans toutes les conditions expérimentales d'intérêt.

Qu'en est-il des réalisations? Grâce à un effort international majeur, nous disposons enfin du premier modèle d'un arbre. Nous avons également de nouvelles trousses d'outils génomiques pour étudier les diverses espèces d'arbres. Les gouvernements connaissent mieux la génomique forestière, et l'industrie forestière est maintenant plus au fait de la génomique qu'il y a deux ou trois ans. En revanche, le secteur forestier demeure quelque peu ambivalent au sujet de la génomique, car il confond souvent génomique et génie génétique. En tant que membres du milieu de la recherche forestière, nous avons la responsabilité d'informer les gens sur les différences fondamentales entre la génomique et la biotechnologie.

La première séquence du génome d'un arbre jamais établie offre d'excellentes perspectives à d'autres initiatives en génomique forestière au Canada. Les plateformes de recherche en génomique forestière sont maintenant bien développées, notamment en Colombie-Britannique et au Québec, et le Canada dispose aussi de chercheurs réputés en biologie végétale, prêts à mettre en application ces outils et à les perfectionner. De plus, la forêt constitue une ressource biologique canadienne de taille, et le Canada est renommé mondialement pour l'excellence de ses réalisations en foresterie et en génomique.

Au Canada, la génomique forestière doit cependant relever certains défis. Le peuplier n'est pas un conifère, et comme le Canada est un pays de conifères, il faut que les futurs travaux de génomique se concentrent maintenant davantage sur des essences d'intérêt commercial, comme le pin et l'épinette. Certaines ressources génétiques forestières canadiennes, autrefois très répandues au pays, ont été gravement érodées. En raison de la disparition d'importantes populations d'amélioration, il pourrait être difficile de tirer pleinement parti des nouveaux outils de génomique. Un bon nombre de ces derniers ont été mis au point durant les activités de recherche en génomique forestière financées par Génome Canada, mais ils ne sont toutefois pas largement accessibles aux chercheurs. Ainsi, on ne sait pas comment les milliers de clones d'ADNc du peuplier seront mis à la disposition des chercheurs lorsque les projets de Génome Canada se termineront ni qui s'assurera que les résultats procurés par cet investissement énorme soient exploités efficacement. D'une manière générale, le Canada ne dispose pas d'un plan à long terme et d'une stratégie nationale concernant la recherche en génomique forestière. La génomique forestière a reçu un financement à court terme et instable, alors que ce type de recherche a vraiment besoin de continuité.

Un autre défi vient de l'industrie forestière qui accorde une plus grande importance à la récolte de la matière ligneuse qu'aux avantages qu'elle pourrait retirer de l'amélioration génétique des arbres ou d'autres applications de la génomique. Pour finir, un défi nous vient des intérêts étrangers; en effet, plusieurs sociétés étrangères de biotechnologie effectuent des recherches en génomique forestière depuis plus longtemps que les sociétés canadiennes et s'accaparent rapidement la propriété intellectuelle associée à leurs travaux.

Il n'en reste pas moins que le Canada est bien placé pour saisir les occasions offertes par les résultats des recherches récentes sur les arbres feuillus et pour établir un lien entre le génotype et les phénotypes d'importance pour le paysage canadien. Il a également une excellente occasion de mettre en application les connaissances acquises grâce à la recherche sur le génome du peuplier pour élaborer des outils de génomique applicable à un conifère modèle. Comme je l'ai souligné précédemment, le Canada a besoin d'une stratégie à long terme sur la génomique forestière et devrait la mettre en œuvre dès que possible. En tant que nation, le Canada doit décider s'il veut ou non tirer parti de ces occasions sans précédent et continuer à être un chef de file de la recherche en génomique forestière.

Génomique fonctionnelle de la régulation dans les arbres forestiers

John MacKay | Centre d'étude de la forêt, Université Laval, Québec (Québec)

Le titre de cet exposé correspond exactement au thème du projet Arborea, c'est-à-dire la « génomique fonctionnelle de la régulation dans les arbres forestiers », et ce thème trouve son origine dans l'intérêt que présente l'étude à grande échelle de la fonction des gènes. Quatre établissements dirigent conjointement Arborea : l'Université Laval (Québec), la Carleton University (Ottawa), le Centre de foresterie des Laurentides (Québec) du Service canadien des forêts (SCF) de Ressources naturelles Canada, et le Center for Computational Genomics and Bioinformatics (CCGB) de la University of Minnesota (Minneapolis). Arborea est l'un des deux grands projets canadiens[1] se consacrant à la découverte à grande échelle de gènes d'arbres. Cette démarche est sans précédent et confère à ces deux projets une envergure internationale. De plus, ces projets ont mis au point un ensemble unique de plateformes expérimentales pour analyser le rôle des gènes dans la formation du bois et dans la santé des forêts.

Je suis le directeur de projet d'Arborea et je vais décrire cette initiative dans la seconde partie de mon exposé. Pour débuter, permettez-moi de présenter mon point de vue sur la génomique forestière. J'y examinerai le lien entre les gènes et la fabrication de produits forestiers et la raison pour laquelle ce lien est essentiel à la compétitivité de l'industrie forestière au Canada.

Lorsque je travaillais comme scientifique à l'Institute of Paper Science and Technology à Atlanta, en Géorgie, Paul Kibblewhite, un spécialiste néo-zélandais des produits forestiers de renommée internationale, a été invité à tenir un séminaire. Il nous a présenté un exposé remarquable sur les divers attributs et propriétés des fibres ligneuses (surtout des résineux) et sur leur importance dans la fabrication du papier. Il a comparé différents types de fibres ligneuses, puis a souligné que l'exemple idéal était les fibres du bois des résineux du Canada.[2] Ces fibres sont très recherchées parce qu'elles sont généralement longues, conférant ainsi au papier sa résistance; leurs parois sont minces et facilitent ainsi la formation de la feuille; de plus, les fibres sont effilées, améliorant ainsi le lissé du papier. Pendant de nombreuses décennies, la fibre de bois des résineux du Canada était en fait considérée comme la meilleure, donnant ainsi naissance à une imposante industrie des pâtes et papiers dans l'ensemble du Canada et, notamment dans l'Est du pays.

Les méthodes de fabrication du papier utilisées par l'industrie ont été mises au point durant la première moitié du 20e siècle et ont continué d'être utilisées jusqu'à la seconde moitié du siècle, surtout parce que l'on croyait que l'approvisionnement en bois était inépuisable. Forte d'un approvisionnement en fibres de grande qualité, conjugué à des coûts de production relativement bas, l'industrie canadienne des produits forestiers s'est emparée d'un important segment du marché. Au fil des ans, le Canada a été capable de maintenir, voire d'augmenter la productivité de l'épinette et de garantir à l'industrie un approvisionnement en fibres en pratiquant un aménagement forestier extensif[3] plutôt qu'intensif. De plus, la sélection génétique a permis d'améliorer considérablement les arbres, notamment l'épinette. À l'aide d'estimations fondées sur l'expérience que j'ai acquise dans l'Est du Canada, je peux montrer que la productivité des forêts a ainsi pu être améliorée, passant d'un niveau assez bas [3 m^3/ha] à très élevé — au moins 10 m^3/ha — l'âge de récolte variant de 35 à 60 ans. Or, durant la seconde moitié du siècle dernier, d'autres pays concurrents ont commencé à adopter d'autres modèles d'aménagement, et l'avantage concurrentiel du Canada a commencé à s'effriter, tout d'abord lentement, puis de plus en plus rapidement. Par exemple, le Brésil produit en l'espace de six ans des eucalyptus d'une trentaine de mètres. Pour y arriver, il a eu recours à la sélection génétique et à l'aménagement intensif des plantations et a tiré parti des conditions favorables de son climat et de ses sols. La productivité de la forêt brésilienne a tellement monté en flèche [environ 50 m^3/ha] qu'elle constitue une menace de taille pour l'industrie forestière canadienne, compte tenu du modèle de production à faible coût et à volume élevé.

Dans les produits forestiers traditionnels de base, comme le papier journal, la pâte commerciale et le bois d'œuvre, réalisés à faible coût et en volumes élevés, la compétitivité du Canada a été considérablement affaiblie. L'industrie forestière canadienne s'est surtout employée à garantir son approvisionnement en matière première, sans se préoccuper de sa qualité ou des moyens d'optimiser son utilisation. Elle s'est maintenue en tête en exerçant un contrôle serré de ses coûts de production. Le bois d'œuvre résineux en est un bon exemple. Ce secteur a maintenu ses profits au fil des ans en accroissant sa production et le volume de ses exportations pour conquérir des parts de marché. Cette stratégie est en partie responsable de l'imposition par les États-Unis de droits compensateurs sur le bois d'œuvre résineux canadien, qui a entraîné la fermeture d'usines au Canada. Cette stratégie ne fonctionne plus, et l'industrie forestière recentre actuellement ses activités afin de demeurer concurrentielle.

L'industrie forestière canadienne doit modifier certains éléments essentiels de ses façons de faire. En premier lieu, elle doit déterminer comment tirer le meilleur parti de la qualité et de la transformation de sa matière première, le bois. En deuxième lieu, elle doit investir davantage dans la conception de produits nouveaux et plus techniques, et s'est même déjà mise à la tâche en raison de l'imposition par les États-Unis de droits compensateurs sur le bois d'œuvre résineux. En dernier lieu, elle doit élaborer des stratégies commerciales appropriées fondées sur

1. Le second est le projet Treenomix de la University of British Columbia.
2. Plus précisément, celles de l'épinette noire (*Picea mariana*).
3. Stratégie d'aménagement de base qui repose presque totalement sur la régénération naturelle et la protection contre les incendies et les insectes.

de nouvelles approches en matière d'innovation de produits, de besoins des clients, de produits à valeur ajoutée et autres aspects de ce genre. Ces trois éléments sont étroitement liés.

La recherche dans les domaines de la génétique et de la génomique peut être très utile à l'optimisation de la matière ligneuse. Le Canada doit produire des produits forestiers de plus grande valeur. Dans le cas d'un certain nombre de produits de base, comme le papier journal, l'industrie des pâtes et papiers ne tire maintenant plus de profits importants et vend même parfois à perte. D'autres produits de l'industrie, comme les papiers minces, ont une grande valeur et génèrent des profits plus substantiels, mais il faut avoir le bon type de matière première pour fabriquer ce type de produit. Une autre solution est de mettre au point des produits forestiers plus performants, permettant à l'industrie forestière du Canada de s'emparer de créneaux et de mettre au point des produits spéciaux. Une troisième solution est de réduire les coûts de production, une avenue qui fait la force de pays comme le Brésil et l'Indonésie — où la productivité est élevée et le coût de la main-d'œuvre faible. Cette stratégie ne semble toutefois plus être avantageuse pour le Canada. Les membres de l'industrie forestière ne s'entendent pas encore sur la stratégie gagnante à adopter, mais ils doivent réfléchir aux répercussions qu'auront les stratégies choisies sur la chaîne de récupération de valeur. Il s'agit en fait de déterminer les qualités recherchées chez les arbres pour que les généticiens forestiers puissent travailler à les améliorer.

Les arbres ne sont pas domestiqués de sorte que leur amélioration génétique doit au départ se faire à partir des populations sauvages qui présentent une grande variabilité. L'amélioration classique des arbres sélectionne les meilleurs sujets, puis les multiplie pour obtenir une population améliorée. C'est un travail de longue haleine, car il faut hybrider les arbres, cultiver leur descendance, prendre des mesures, puis passer à l'étape suivante. Cette démarche est lente, graduelle et généralement axée sur la productivité des forêts. Des méthodes nouvelles et plus dynamiques feront appel à la multiplication végétative et privilégieront la qualité, la performance et la valeur des produits du bois plutôt que la seule productivité des forêts. De plus, à l'échelle mondiale, l'amélioration des arbres a de plus en plus tendance à utiliser une combinaison de génomique et de techniques moléculaires, comme le génie génétique.

Plusieurs groupes de recherche, y compris l'Oak Ridge National Laboratory du Tennessee, ont déjà établi des cartes de liaison pour les pins, les épinettes, les peupliers et quelques autres espèces. Ces cartes peuvent être considérées comme une représentation approximative des chromosomes et indiquent les régions du génome où se trouvent les gènes contrôlant la densité du bois. Même si c'est là un pas dans la bonne direction, les scientifiques ont vite réalisé que chacune des régions identifiées grâce à la cartographie de la variation phénotypique des phénotypes — dite QTL, sigle de « quantitative trait loci », c'est-à-dire locus quantitatifs — contenait des centaines de gènes. Pour que les QTL soient utiles en amélioration des arbres, il nous faudrait déterminer quel est le gène d'une région donnée qui contrôle la variation sous-jacente du caractère. Cette étape est particulièrement importante puisqu'un examen d'autres caractères d'importance met en évidence un nombre grandissant de régions (et, par conséquent, des centaines et des centaines de gènes) qui peuvent jouer un rôle dans l'expression du caractère. Pour déterminer quels sont les gènes importants, puis les utiliser efficacement en sélection moléculaire, les scientifiques doivent comprendre la fonction des gènes et leur régulation globale dans le génome. Je vais me servir de l'exemple d'un gène que nous avons étudié à l'Université Laval pour illustrer comment l'information génétique peut servir à comprendre les propriétés du bois, à améliorer ces propriétés et à influer sur la fabrication et la performance d'un produit. Ce gène, qui est naturellement présent chez les pins, confère une meilleure réactivité au bois, produisant ainsi une lignine plus soluble qui facilite la réduction en pâte. Nous avons utilisé des marqueurs moléculaires pour identifier, parmi les descendants d'un arbre possédant le gène produisant ce type de lignine, lesquels étaient également dotés d'une copie de ce gène. Nous avons ensuite examiné les caractéristiques de réduction en pâte. Nous avons constaté que la réduction en pâte du bois des arbres doté du gène en question nécessitait moins d'énergie (c'est-à-dire que le temps de contact était plus court) et que la feuille de papier produite à partir de cette pâte était plus résistante que celle produite à partir de la pâte d'arbres dépourvus de ce gène. C'est probablement parce que le temps de contact nécessaire pour réduire en pâte les arbres à lignine altérée est plus court, une plus longue cuisson étant reconnue pour dégrader certains des caractères souhaitables de la pâte.

Ceci dit, je vais maintenant vous parler d'Arborea. Un des objectifs du projet est de découvrir des gènes et, à cette fin, nous utilisons deux méthodes : le séquençage des EST (étiquettes de séquences exprimées) et l'étiquetage par activation. Brian Ellis vous a déjà exposé comment les EST ont été utilisées pour séquencer le génome du peuplier. Je vous parlerai un peu plus tard de la façon dont nous les avons utilisées pour séquencer le génome de l'épinette. Nos travaux sur le peuplier utilisent la seconde méthode, l'étiquetage par activation (ou mutations « gain de fonction »). Avec cette méthode, vous laissez les arbres vous révéler leurs gènes et leurs fonctions en modifiant l'expression génique et en examinant les variations des phénotypes des arbres. L'étiquetage par activation est une plateforme importante pour découvrir des gènes et connaître leur fonction. Elle nous a permis de créer une collection unique de lignées qui, à compter de 2005, seront mises à la disposition des chercheurs afin de poursuivre les recherches à long terme. Sharon Reagan de la Carleton University dirige cette partie du projet Arborea.

Compte tenu de la somme de travail considérable sur le peuplier qu'ont effectué les scientifiques, nous avons fait converger nos efforts sur la découverte de gènes de l'épinette. Nos résultats du séquençage des EST de l'épinette sont maintenant disponibles. Nous avons exécuté environ 73 000 réactions de séquençage sur des molécules d'ADN complémentaire (ADNc) — qui représentent des gènes exprimés d'épinette. Bien entendu, il a fallu traiter ces séquences pour éliminer l'information de piètre qualité qu'elles contenaient et exciser les séquences du vecteur, puis effectuer l'assemblage pour établir une estimation du nombre de gènes qu'elles représentent vraiment. Nos estimations

actuelles sont de 16 000 gènes d'épinette, mais le nombre en est probablement un peu plus faible. Nous avons travaillé à l'annotation d'un jeu d'unigènes afin d'assigner des fonctions à ces gènes. À mesure que les données sur les séquences deviennent disponibles, nous les versons dans des bases de données publiques et dans BioData, une base de données par projet, publiquement accessible par Internet. Les clones nous servent de réactifs pour créer des biopuces pour découvrir des SNP (polymorphisme d'un seul nucléotide), apparier les gènes et explorer les données pour découvrir la fonction de gènes. L'information est versée dans les bases de données relationnelles appelées SpruceDB et ForestTreeDB, qui peuvent être interrogées de diverses façons et qui seront publiquement accessibles. Le CCGB collabore à l'élaboration de la base de données. Nous avons également à cœur d'appuyer la distribution des clones d'épinette obtenus dans le cadre de notre projet et nous devrions être en mesure de rendre la totalité de nos collections disponibles dès le début de 2005.

Arborea a également pour objectif d'effectuer une étude à grande échelle de la fonction et de la diversité des gènes. Nous nous intéressons à la formation du bois, un processus complexe, et aux mécanismes de défense des arbres. Nous étudions notamment les gènes responsables des molécules de signalisation chez le peuplier et la façon dont ils interviennent dans la réaction de défense des arbres contre un pathogène. Pour analyser la fonction et la diversité des gènes, nous utilisons des gènes candidats exprimés chez des arbres transgéniques; l'objectif n'est pas de déployer des arbres transgéniques mais de les utiliser plutôt comme plateforme expérimentale. Nous pouvons ensuite analyser les arbres au niveau du transcriptome complet à l'aide de biopuces et identifier par la suite des gènes cibles pour l'amélioration des arbres ou l'évaluation de leur performance. Nous examinons ces mêmes gènes, mais sous l'angle de la diversité, grâce à la plateforme technologique d'arbres transgéniques mise au point par le groupe d'Armand Séguin au Centre de foresterie des Laurentides. Cette plateforme, une caractéristique unique aux initiatives canadiennes d'Arborea, nous permet de produire et d'analyser des épinettes transgéniques à une échelle significative. Ainsi, l'hiver dernier, notre serre abritait près de 6 000 semis d'épinettes transgéniques. De plus, nous avons mis au point des biopuces de première génération avec des jeux d'unigènes d'environ 9 000 gènes d'épinette et 3 700 gènes de peuplier. Nous avons établi un circuit de gestion et d'analyse des données et notre prochaine étape consistera à assurer la coordination entre Arborea et Treenomix afin que nos biopuces de deuxième et troisième génération soient plus puissantes et mieux coordonnées au niveau canadien. Là encore, les biopuces s'inscrivent dans notre stratégie de distribution des ressources qui vise à les mettre à la disposition d'autres scientifiques canadiens.

L'approche transgénique de découverte des fonctions des gènes nous permet de perturber le système de l'arbre afin de comprendre son mode de fonctionnement. Les connaissances ainsi acquises peuvent être utiles à l'industrie forestière. Ainsi, la surexpression d'un facteur de transcription provoque un déséquilibre du rapport entre le xylème et le phloème. Les arbres ainsi modifiés peuvent alors être utilisés, en combinaison avec nos biopuces, pour comprendre comment la régulation génique est contrôlée au niveau global. Ces données sont actuellement utilisées pour sélectionner des marqueurs de gènes candidats qui seront utilisés expérimentalement pour découvrir des marqueurs de sélection génétique chez les arbres dont le bois possède des propriétés recherchées. Les méthodes de sélection génétique que nous espérons mettre au point avec l'aide de marqueurs réduiront le temps de sélection et rendront la démarche plus précise puisque la sélection ne sera plus fondée sur le phénotype mais bien sur le gène.

Pour terminer, j'aimerais remercier les chercheurs affiliés aux quatre établissements collaborant à Arborea; ils apportent une contribution importante à la génomique forestière.

Amélioration génétique des arbres et interactions génomiques dans le contexte des ravageurs forestiers

Armand Séguin | Centre de foresterie des Laurentides, Service canadien des forêts, Ressources naturelles Canada, Québec (Québec)

Je fais partie d'une équipe du Centre de foresterie des Laurentides, situé à Québec (Service canadien des forêts [SCF], Ressources naturelles Canada). Nous menons deux projets qui s'insèrent dans le contexte général des activités de recherches en génomique du SCF.[1] L'un de ces projets porte sur la production d'arbres génétiquement améliorés et la création d'une plateforme nationale de génomique fonctionnelle pour les collaborateurs. L'autre s'intéresse aux génomes qui interagissent en réaction aux mécanismes de défense de l'arbre et vise à mettre au point des méthodes de protection des forêts acceptables sur le plan environnemental.

Tout comme le chimiste a besoin de la classification périodique des éléments pour fabriquer du plastique, le biologiste a besoin d'information sur le code génétique pour comprendre comment les organismes vivants sont faits. La totalité de l'information génétique est contenue dans l'ADN qui code pour les protéines à partir desquelles s'édifie l'organisme vivant. Le code génétique de tous les êtres vivants est semblable à un programme d'ordinateur. Toute l'information nécessaire pour accomplir une tâche précise est écrite dans un code de programme spécifique. Toutefois, les organismes vivants sont beaucoup plus complexes que les ordinateurs et leurs caractères propres dépendent des interactions entre le code génétique et l'environnement. Le code génétique est encodé dans les chromosomes situés dans le noyau cellulaire, le centre de contrôle de la cellule vivante.

L'ADN est composé de quatre éléments fondamentaux ou bases : la guanine, l'adénine, la thymine et la cytosine (G, A, T et C). Celles-ci constituent le code de base ou l'alphabet à partir duquel est écrite l'information contenue dans les gènes. Les gènes sont groupés pour constituer les chromosomes. Le code génétique est universel, c'est-à-dire qu'il est écrit dans le même langage chez tous les organismes vivants, ce qui permet de comparer les gènes des bactéries, de l'homme et des végétaux. La totalité du matériel génétique contenu dans les chromosomes d'un organisme donné (c'est-à-dire, son génome) est présente dans chaque cellule de cet organisme, de sorte que chaque cellule possède l'information codée permettant d'accomplir chaque tâche cellulaire de l'organisme.

Les croisements génétiques classiques permettent l'échange de segments de chromosome porteurs d'un gène recherché ou plus, et ce brassage génétique produit des sujets d'un phénotype donné qui possèdent des caractères supérieurs. Cependant, l'échange de régions chromosomiques peut parfois aboutir à des effets négatifs non visés. Par ailleurs, le génie génétique peut maintenant servir à introduire un gène conférant un caractère utile, comme une résistance à un insecte, chez un génotype donné. Il en résulte l'acquisition d'un nouveau caractère. La méthode habituelle consiste à couper un maillon de la chaîne d'ADN à un endroit précis à l'aide d'un enzyme de restriction (sorte de ciseaux moléculaires). Cet enzyme sert à couper un plasmide, une molécule d'ADN circulaire extrachromosomique présente chez certaines bactéries. Le fragment d'ADN est introduit dans le plasmide au site de coupure. La molécule ainsi obtenue porte maintenant le nom de construction et permet de transférer l'ADN d'un organisme à un autre. Cette construction peut ensuite être introduite dans une cellule receveuse. Des plasmides d'*Agrobacterium tumefaciens*, une bactérie naturellement présente dans le sol, sont largement utilisés pour transférer des gènes dans des cellules végétales, y compris des cellules d'arbres. Lors du processus naturel d'infection d'une cellule végétale par *Agrobacterium*, la construction introduira le nouveau gène dans la cellule de l'arbre hôte.

Les dégâts causés aux arbres par des insectes ravageurs et des champignons pathogènes réduisent énormément le volume de bois qui peut être récolté dans les forêts du Canada. Par ailleurs, de nouvelles politiques de protection de l'environnement imposent une interdiction totale des pesticides chimiques dans les écosystèmes naturels. Les progrès récents des techniques de transformation permettent maintenant d'introduire des gènes clonés chez les espèces cultivées pour les améliorer et offrent un moyen d'effectuer des modifications génétiques conférant une résistance aux organismes nuisibles. En nous appuyant sur l'effet bien documenté des cristaux protéiques de *Bacillus thuringiensis (B.t.)* sur les insectes, nous avons transformé génétiquement l'épinette blanche (*Picea glauca*) en introduisant un gène synthétique de la toxine du *B.t.* qui s'active contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette (*Choristoneura fumiferana*). Les arbres dotés de ce gène sont capables de produire eux-mêmes cet insecticide biologique. Les arbres transgéniques issus de ces travaux ont présenté une grande résistance à la tordeuse des bourgeons de l'épinette lors d'essais en laboratoire, et une immunité a même été observée chez certaines lignées. La protéine insecticide du *B.t.* est utilisée commercialement depuis de nombreuses années, et aucun cas de résistance à celle-ci n'a été signalé sur le terrain chez des populations de la tordeuse des bourgeons de l'épinette. Toutefois, plusieurs espèces communes d'autres insectes ravageurs ont acquis une résistance au *B.t.*, tant en laboratoire que sur le terrain. Il faut donc mettre au point d'autres outils de lutte biologique contre les ravageurs forestiers. Au CFL, nous tentons actuellement d'identifier des gènes, comme ceux des défensines et des inhibiteurs de la protéase, participant à la protection des arbres contre les ravageurs forestiers.

Au cours de la dernière décennie, le Projet du génome humaine a ouvert la voie à une science d'avant-garde et excitante, la génomique. La génomique s'intéresse à beaucoup plus que quelques

1. Ces activités sont les programmes 3 et 4 de l'Initiative de recherche-développement en génomique du SCF.

gènes choisis : c'est la science du génome. Les chercheurs en génomique veulent déchiffrer et comprendre toute l'information génétique des chromosomes d'un organisme afin de déterminer la relation entre les activités des gènes et les fonctions des cellules. La génomique se compose de deux volets : la **génomique structurale** (détermination des cartes et des séquences du génome) et la **génomique fonctionnelle** (découverte de la fonction biologique de gènes particuliers et du mode de fonctionnement des produits géniques). À mon avis, la génomique est la clé du futur de l'industrie de la biotechnologie. Elle s'applique non seulement au génie génétique, mais pourrait également, par exemple, influer énormément sur l'amélioration des arbres.

Face à la nécessité évidente de protéger les forêts de la planète, il faut se doter de meilleures technologies et pratiques d'aménagement pour conserver et mieux utiliser les ressources actuelles. Le Canada et plusieurs autres pays mènent depuis quelques décennies des travaux de sélection et d'amélioration d'arbres productifs destinés à être cultivés dans des plantations. La recherche en génomique devrait permettre d'identifier des séquences d'ADN et des marqueurs génétiques qui aideront à accélérer la sélection et l'amélioration des arbres et à les rendre plus précises. Cette application est appelée la sélection moléculaire. La conversion des forêts du Canada en plantations transgéniques, en monocultures ou en fermes de production de fibre n'est ni une nécessité ni le but visé. Seule une petite fraction (environ 0,1 %) du total de la superficie forestière du Canada est actuellement reboisée chaque année. Les plantations faisant l'objet d'un aménagement intensif à des fins de production de bois et de fibres ligneuses s'inscrivent dans une stratégie globale visant à répondre à la demande grandissante de produits du bois sans empiéter sur les vieilles forêts et les habitats sauvages. Elles contribueront à garantir la durabilité à long terme des ressources forestières du Canada.

Un autre volet de notre programme s'intéresse aux génomes en interaction : nous évaluons comment la génomique des arbres peut contribuer à mieux protéger les arbres contre les attaques des ravageurs. Les arbres ont une grande longévité, un signe qu'ils ont développé des mécanismes de défense distincts leur permettant de survivre à long terme. À l'heure actuelle, les problèmes causés par les ravageurs forestiers sont souvent sous-estimés, et de nombreux champignons pathogènes gagnent du terrain dans les peuplements naturels et les plantations. De plus, compte tenu de l'augmentation des échanges commerciaux internationaux et des effets de l'évolution du climat de la planète, les problèmes de ravageurs forestiers devraient s'aggraver encore plus. Il est donc important de comprendre comment les arbres se défendent contre les ravageurs. Les ravageurs forestiers exotiques peuvent être particulièrement problématiques, comme l'illustrent les ravages causés par la maladie hollandaise de l'orme dans l'Est de l'Amérique du Nord au cours du dernier siècle.

Les interactions hôte-pathogène sont importantes; en matière de santé humaine, l'exemple de la grippe est éloquent. Chaque année nous amène une nouvelle souche du virus de la grippe contre laquelle l'homme (l'hôte) produit des anticorps. Il y a une interaction entre l'hôte et le pathogène : l'homme tente de lutter contre les virus de la grippe et, en même temps, les virus tentent de vaincre notre système immunitaire. Le même phénomène se produit en forêt entre les arbres et des champignons pathogènes ou des insectes ravageurs. Les arbres utilisent des mécanismes ou des stratégies différentes pour se défendre. Ils n'ont pas de système immunitaire pour produire des anticorps, mais produisent plutôt des substances chimiques complexes ou des protéines. La production de ces composés peut être continue, comme dans le cas des résines ou de la lignine, ou peut être déclenchée par une attaque contre l'arbre. Les organismes nuisibles s'adaptent habituellement aux mécanismes de défense des arbres, par exemple en produisant des enzymes qui détoxifient les composés produits par la plante pour se défendre.

La régulation de l'expression du génome a été largement étudiée chez les végétaux, mais l'étude simultanée de deux génomes en interaction (celui de l'hôte et celui du parasite) est un domaine en grande partie inexploré. Le peuplier est devenu l'essence modèle de la recherche en génomique en raison de ses vastes ressources génétiques, de sa croissance initiale rapide et de sa facilité de multiplication clonale ainsi que de l'existence de protocoles de transformation courants. On a récemment terminé le séquençage de son génome.

De plus, les génomes d'un cortège de microorganismes associés avec les arbres sont actuellement séquencés, et le CFL participe à un projet de séquençage complet du génome de la rouille du peuplier *Melampsora*, ce qui en ferait la premier pathogène d'un arbre à être séquencé. Nous avons acquis une expertise en matière de caractérisation des interactions hôte-pathogène et nous avons déjà séquencé les banques d'ADN complémentaire des interactions hôte–pathogène compatibles et incompatibles du pathosystème peuplier–*Melampsora*.[2] Nous espérons que ces connaissances permettront de découvrir de nouveaux gènes de résistance chez l'hôte et les gènes de pathogénicité associés chez l'organisme pathogène. Ces nouveaux gènes cibles pourraient être utilisés par les programmes d'amélioration moléculaire des arbres. L'identification des profils génétiques de pathogènes permettra de comprendre et de contrôler l'évolution du pathogène lorsque celui-ci réagit à la résistance de l'hôte. Ce projet devrait aider le Canada à se doter d'outils et de ressources permettant une gestion plus durable de ses forêts lorsqu'elles sont menacées par des organismes nuisibles.

L'utilisation d'oligosaccharides en lutte biologique pour stimuler les mécanismes de défense de l'arbre est également une avenue très prometteuse. Nous avons effectué certains travaux sur l'oligosaccharide de chitosane dérivé de la chitine, une substance constituant l'exosquelette des arthropodes, comme le crabe, le homard et la crevette. Les déchets industriels de ce biomatériau peuvent être recyclés et transformés en un produit pour immuniser les arbres contre des organismes nuisibles.

2. Une interaction hôte–pathogène est dite **compatible** lorsque l'agent pathogène réussit à envahir l'hôte; elle est **incompatible** lorsque l'agent pathogène provoque une réaction de défense chez l'hôte résistant et qu'il ne réussit qu'à l'envahir un peu ou pas du tout.

Au nombre des applications potentielles de cette technologie, mentionnons la lutte contre les organismes nuisibles dans les pépinières et les plantations. Nous avons montré que l'application d'oligosaccharides de chitosane induit l'expression de divers gènes de l'arbre; notre défi actuel consiste donc à corréler l'expression de ces gènes aux mécanismes précis de défense de l'arbre.

Dans l'ensemble, la génomique forestière est une discipline fondée sur le savoir. En d'autres termes, les résultats des recherches effectuées et les modèles élaborés à l'égard du peuplier seront applicables à nombre d'autres essences et situations. Ainsi, les connaissances acquises lors de l'étude des interactions entre le peuplier et la rouille *Melampsora* pourraient également être applicables à d'autres pathosystèmes, comme celui du pin blanc – rouille vésiculeuse du pin blanc (*Pinus strobus–Cronartium ribicola*). Cette recherche pourrait aussi engendrer des avantages économiques par le biais de la perception de droits de propriété intellectuelle sur les fonctions des gènes, les marqueurs moléculaires et les promoteurs qui ont été découverts.

J'aimerais remercier l'Initiative de R-D en génomique du SCF, la Stratégie canadienne de la biotechnologie, l'Université Laval, le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada et Génome Canada–Génome Québec pour leur aide financière à nos recherches ainsi que les chercheurs et les étudiants des cycles supérieurs de l'Université Laval et de l'Université de Sherbrooke pour leur dévouement.

Génomique et fonctions des défenses induites par les insectes chez l'épinette et le peuplier

Jörg Bohlmann | Michael Smith Laboratories, University of British Columbia, Vancouver (Colombie-Britannique)

Brian Ellis a déjà traité de nombreux aspects du projet Treenomix lors de son exposé [voir la page 17]. Brian et moi-même, ainsi que Carl Douglas et Kermit Ritland, sommes les quatre chercheurs principaux de Treenomix. Mon exposé présente un aperçu de Treenomix et de sa stratégie de découverte de gènes. Je décris ensuite le volet sur la santé des forêts du projet. À cette fin, je traite de certains de nos objectifs et ressources clés en matière de développement de la technologie de génomique ainsi que de certaines applications et découvertes. J'aborde brièvement la recherche fonctionnelle de gènes de défense chez les conifères. Enfin, je propose certaines orientations que pourraient prendre la génomique forestière dans le futur.

Treenomix, le premier projet de génomique forestière qui a été financé au Canada, est appuyé par Genome British Columbia (BC) et la province de la Colombie-Britannique. Outre son financement important, Treenomix a reçu un soutien administratif constant de Genome BC et un appui quotidien de la province sur le plan de la recherche. Treenomix vise à intégrer des méthodes de génomique structurale, fonctionnelle et comparative et à cette fin, il utilise comme système de référence l'*Arabidopsis*, une plante herbacée. Le projet porte sur la santé des forêts, ses recherches s'alignant de près sur certains objectifs clés du programme d'amélioration des arbres du Ministry of Forests and Range de la Colombie-Britannique. Au pays, il compte des partenaires parmi les universités, les gouvernements et l'industrie, et à l'échelon international, il a conclu des partenariats officiels avec des organismes de plusieurs pays, y compris les États-Unis, la Suède et la Finlande. Treenomix, en combinaison avec d'autres projets sur les forêts financés par Génome Canada, a contribué à positionner le Canada comme un chef de file international de la génomique forestière.

Treenomix fait converger ses efforts sur la découverte de gènes de l'épinette et du peuplier. Brian Ellis a déjà décrit la contribution de Treenomix à l'International *Populus* Genome Consortium, un consortium international de recherche sur le génome du peuplier. De plus, les chercheurs de Treenomix étudient l'épinette et le peuplier afin d'identifier et de caractériser la fonction de gènes candidats impliqués dans la formation et la qualité du bois et des fibres et dans les interactions ravageur-hôte.

Grâce aux sommes importantes investies en génomique forestière par Génome Canada, les chercheurs disposent maintenant d'outils de génomique spécifiques aux forêts. Treenomix met à la disposition d'autres chercheurs des marqueurs génétiques et des ressources du domaine public. On lui doit également de la propriété intellectuelle, comme des brevets.

De plus, Treenomix a permis de doter le pays de professionnels hautement qualifiés spécialisés en génomique forestière. Aucun des chefs de projet n'avait de formation en génomique. L'équipe réunie pour ce projet se compose de diplômés des cycles supérieurs provenant d'horizons divers et dont l'enthousiasme pour les questions de génomique forestière a tôt fait de les transformer en un groupe indispensable d'experts. De plus, les professionnels de Treenomix fournissent maintenant un soutien aux chercheurs des programmes d'intendance des forêts universitaires dans les organismes gouvernementaux et industriels. Treenomix vise à se doter de différentes capacités lui permettant d'aborder des questions connues de longue date ainsi que des enjeux nouveaux. À cette fin, il intègre la recherche en génomique forestière à des méthodes classiques de biotechnologie et d'amélioration des arbres, ce qui a une influence sur la recherche forestière menée au Canada par les universités, les gouvernements et le secteur privé.

Pour découvrir des gènes, Treenomix utilise différentes ressources technologiques qui s'intéressent aux arbres au niveau du génome, du transcriptome[1] et du protéome. L'accent mis sur la génomique ne doit pas faire perdre de vue l'importance du protéome et du métabolome[2]. Les chercheurs de Treenomix ont commencé à s'intéresser relativement tard à la protéomique, lorsqu'ils ont constaté le potentiel qu'offrait la combinaison des profils d'expression génique et des annotations aux profils d'expression protéique. Cette approche s'est avérée utile pour découvrir des gènes, notamment chez l'épinette, puisque aucun génome de conifères n'avait encore été annoté. Treenomix s'intéresse également au métabolome, car celui-ci est très proche du phénotype de l'arbre; le métabolome comprend les métabolites qui forment le bois, les fibres et les défenses chimiques d'un arbre. Les chercheurs de Treenomix mettent à profit ces méthodes particulières et les combinent à la génomique pour découvrir des gènes d'intérêt chez l'arbre.

Le volet sur la santé des forêts du projet Treenomix consiste à étudier au niveau du génome les interactions de l'épinette avec les insectes ravageurs. Les interactions de différentes essences d'épinette avec la tordeuse occidentale de l'épinette (*Choristoneura occidentalis*) en sont un exemple. Durant ce symposium, on en apprendra davantage sur la tordeuse des bourgeons : comment elle attaque un arbre, comment l'arbre se défend, etc. L'épinette interagit également avec certains insectes perceurs des tiges; l'un d'eux est le charançon du pin blanc (*Pissodes strobi*) qui, malgré ce que peut laisser croire son nom, est également nuisible aux peuplements et aux plantations d'épinette de la Colombie-Britannique.

Le charançon du pin blanc attaque l'épinette en mai-juin, avant ou pendant le débourrement. Il dépose ses œufs dans des trous d'alimentation pratiqués dans l'écorce de la flèche (pousse

1. Le transcriptome est l'ensemble des ARN messagers qui résultent de la transcription des gènes codant pour une protéine. Les ARN messagers servent de matrice pour la synthèse des protéines.
2. Le protéome est l'ensemble des protéines exprimées par le génome d'un organisme donné à un moment précis et dans des conditions spécifiques; le métabolome est l'ensemble des métabolites et des voies métaboliques d'un organisme.

apicale ou partie terminale de la tige). Dès leur éclosion, les larves creusent des galeries sous l'écorce et dévorent l'écorce interne en direction de la base de la tige, provoquant le flétrissement du verticille supérieur. Quelques larves suffisent à détruire deux années de croissance. Dans les plantations d'épinette de Sitka (*Picea sitchensis*), les infestations du charançon provoquent des déformations qui réduisent considérablement la qualité des arbres et permettent à la compétition végétale de proliférer. Ainsi, les plantations établies par John King du Ministry of Forests and Range de la Colombie-Britannique ont été dévastées par le charançon du pin blanc. King et son équipe évaluent actuellement la résistance à cet insecte chez des épinettes récoltées un peu partout dans la province et le pays. Dans le cadre de leur programme d'amélioration des arbres, ils font des croisements entre diverses lignées d'épinette, croisant deux lignées résistantes, deux lignées sensibles ou l'une et l'autre. Treenomix peut maintenant utiliser ces arbres pour en étudier les défenses et les mécanismes potentiels de résistance en collaboration avec la Direction de l'amélioration des arbres du ministère.

Pendant les premières années où il a reçu un financement de Génome Canada, Treenomix a eu pour mandat de mettre au point des technologies. Les principaux travaux ont en effet permis de rajouter de nouvelles technologies à l'arsenal dont disposaient la biotechnologie et l'amélioration des arbres. Au cours de la prochaine étape (Concours III de Génome Canada), Treenomix sera en mesure de se pencher sur des enjeux anciens et nouveaux en intégrant les technologies qu'il a mises au point aux méthodes et ressources existantes. Lorsque le Ministry of Forests and Range a mis sur pied son programme d'amélioration des arbres, il n'avait pas envisagé que les arbres puissent servir aux recherches de Génome Canada. Or ces arbres sont maintenant à la disposition de la recherche en génomique forestière, et le fruit de cette recherche est à son tour applicable aux programme publics d'intendance des forêts.

Les séquences d'ADN complémentaire (ADNc) constituent un outil qui peut servir à découvrir des gènes et à mettre au point des marqueurs. Le programme de séquençage d'EST (étiquettes de séquences exprimées) chez l'épinette de Treenomix vise à séquencer 135 000 lectures en 3′ et 22 500 lectures en 5′ de clones d'ADNc; 100 000 lectures en 3′ ont déjà été effectuées. De même, le séquençage du génome du peuplier progresse très bien et représente la contribution de Treenomix à l'identification et à l'annotation des gènes dans le cadre de l'International *Populus* Genome Consortium. Ce domaine de recherche est dirigé par Kermit Ritland qui explore toutes les séquences afin de mettre au point des marqueurs et d'entreprendre la production et l'analyse de puces à ADN ainsi que des analyses du protéome. Les résultats sont saisis dans des bases de données hébergées par le Genome Sciences Centre de Vancouver, auxquelles les collaborateurs de Treenomix ont accès. Les bases de données fournissent une panoplie d'outils qui ne sont généralement pas disponibles. De plus, Treenomix a mis au point des puces à ADN pour du tissu ligneux à différents stades de développement. La puce à ADN d'épinette la plus récente comprend près de 22 000 éléments d'ADNc, ce qui en fait un outil de recherche durable. De même, Treenomix met actuellement au point une banque de puces à ADN du peuplier afin de faciliter l'identification des gènes qui contrôlent la formation du bois et la résistance aux insectes et aux maladies.

Treenomix mobilise ses ressources en génomique forestière pour arriver à mieux comprendre les mécanismes, les gènes, les protéines et les métabolites intervenant dans la défense et la résistance des arbres contre les insectes ravageurs et les pathogènes. Les arbres possèdent un large éventail de défenses constitutives et inductibles, de nature chimique et anatomique. Nous en connaissons très peu sur la régulation génétique de ces diverses défenses et sur leur mode de communication, pas plus que nous ne savons si l'induction des défenses a un impact sur la formation du bois et des fibres. Les chercheurs ne font que commencer à décortiquer ces mécanismes à l'aide de méthodes de biotechnologie et de génétique moléculaire. La méthode d'étude d'un seul gène à la fois qui était utilisée auparavant a été délaissée, car elle ne permettait pas d'identifier clairement les éléments de la régulation génétique. Fort heureusement, les outils de recherche mis au point à partir d'une espèce peuvent s'appliquer à d'autres systèmes forestiers canadiens. Ainsi, les puces à ADN d'épinette peuvent servir à l'expression de gènes de pins tordus latifoliés (*Pinus contorta* var. *latifolia*) attaqués par le complexe formé par le dendroctone du pin ponderosa–champignon du bleuissement (*Dendroctonus ponderosae–Ophiostoma clavigerum*).

Le Concours III de Génome Canada donne aux chercheurs l'occasion de proposer des orientations futures pour la génomique forestière, et le présent forum leur fournit un cadre pour nouer de nouvelles alliances ou renforcer des existantes. Dans l'avenir, je voudrais mieux intégrer ma recherche à celle des organisations fédérales et provinciales d'intendance des forêts afin d'aborder les problèmes de santé des forêts et d'économie forestière viable, sans jamais perdre de vue notre contexte forestier particulier. La foresterie exige une planification et un développement à long terme des ressources ligneuses. En effet, les arbres demeurent au même endroit pendant des centaines d'années, et les généticiens forestiers ne peuvent dans un court délai se tourner vers une essence différente en cas d'échec d'une autre. De plus, la recherche en génomique devrait s'employer à résoudre certains des problèmes d'aménagement forestier qu'éprouve le Canada, comme la menace que posent les insectes ravageurs et les pathogènes indigènes ou exotiques et les effets des changements climatiques. En outre, la recherche en génomique peut nous aider à comprendre la relation entre la résistance induite des arbres et la formation du bois.

Pour terminer, j'aimerais souligner l'excellent travail des chercheurs avec qui je collabore dans le cadre du projet Treenomix, soit Brian Ellis, Carl Douglas et Kermit Ritland, ainsi que de l'équipe de techniciens, d'attachés de recherche et de gestionnaires de laboratoire.

Faire le pont entre la génomique structurale et la génomique fonctionnelle chez l'épinette

Bob Rutledge | Centre de foresterie des Laurentides, Service canadien des forêts, Ressources naturelles Canada, Québec (Québec)

L'objet de cette présentation est d'exposer certains des principaux aspects d'un projet de longue date que je mène en collaboration avec ma collègue Krystyna Klimaszewska, ainsi qu'un projet de recherche de Nathalie Isabel, qui est notre chercheure principale en génomique structurale au Centre de foresterie des Laurentides. Ces projets de recherche sont axés sur les possibilités commerciales qui pourraient résulter d'une amélioration de la productivité forestière. Ils visent principalement à trouver et à multiplier des conifères dotés de caractères d'élite influant par exemple sur la qualité des fibres ou sur le taux de croissance. Je vais en outre expliquer comment nous tirons parti des possibilités sans précédent offertes par la génomique fonctionnelle. Je vais me concentrer principalement sur la régulation génétique du développement tissulaire chez les conifères, puisque c'est mon domaine de spécialité.

Comment peut-on donc arriver à produire des semis de conifères dotés de caractères supérieurs? On peut utiliser essentiellement trois approches à cette fin :

- la sélection classique — un processus lent en raison du temps de génération des arbres, mais toutefois efficace;
- le génie génétique — un processus très rapide, offrant un potentiel sans précédent, et
- la multiplication clonale d'arbres d'élite — un processus rapide et efficace, mais actuellement applicable uniquement aux arbres au stade juvénile.

Ces trois approches peuvent certes bénéficier de la recherche en génomique, mais c'est la troisième qui a été l'objet principal de notre recherche en génomique fonctionnelle. Traditionnellement, l'industrie forestière a beaucoup utilisé les boutures racinées pour assurer la multiplication clonale des conifères. Cette approche n'est malheureusement applicable qu'aux jeunes arbres, car les conifères perdent leur capacité de raciner à mesure qu'ils parviennent à maturité et commencent à se reproduire par voie sexuée. C'est là un facteur très limitant puisque nombre de caractères importants ne peuvent être identifiés que chez les sujets adultes.

On peut alors opter pour une autre technique de multiplication — et un important domaine de recherche pour mes deux collègues — c'est-à-dire l'obtention de semis dérivés de cultures tissulaires au moyen d'embryons « somatiques », des embryons obtenus par voie asexuée à partir de tissus. Les techniques de culture tissulaire permettent de contourner plusieurs limites des boutures racinées, par exemple produire un nombre illimité de semis et conserver les génotypes individuels par cryopréservation. En raison de leurs caractéristiques, ces techniques de culture tissulaire ont pu être exploitées commercialement pour multiplier massivement les semis de conifères. Fait important, la multiplication clonale fondée sur ces techniques fournit une avenue commerciale pour le déploiement de tout nouveau génotype d'arbre, car elle permet de se soustraire aux longs délais liés à la multiplication classique de graines. Les nombreux pays actuellement dotés de programmes de recherche sur la production de semis somatiques et sur les techniques connexes, y compris les États-Unis, la Suède, la Nouvelle-Zélande, la Norvège et la France, témoignent de la grande importance de ce domaine.

Malgré son importance scientifique et économique, la production de semis à partir d'embryons somatiques a un inconvénient de taille : la production de cellules souches embryogéniques, par le biais d'un processus appelé embryogenèse somatique, ne peut être accomplie qu'à l'aide d'embryons extraits de graines. Par conséquent, cette technique, à l'instar des boutures racinées de jeunes arbres, ne peut actuellement servir qu'à la multiplication de génotypes d'arbres non éprouvés.

Un aspect important de notre programme de recherche concerne l'exploitation de la génomique fonctionnelle pour mieux comprendre les phénomènes génétiques sous-jacents de l'embryogenèse somatique, puis élaborer des protocoles qui finiront par permettre l'utilisation d'autres tissus que ceux des graines pour initier des cultures de tissu embryogénique. À terme, on pourrait faire ces cultures à partir de tissus végétaux prélevés chez des arbres adultes.

Comment y arriver? Nous avons concentré nos efforts sur un groupe choisi de gènes codant pour des facteurs de transcription, soit des protéines qui régulent l'activité d'autres gènes. Un avantage important lié à l'utilisation de ce type de gène est le fait que chaque facteur individuel de transcription contrôle l'activité de milliers de gènes. En fait, c'est là le mécanisme sous-jacent grâce auquel un sous-ensemble élite de facteurs de transcription, appelés régulateurs du développement, contrôle la formation des cellules souches à partir desquelles se développent tous les tissus, y compris les embryons somatiques. Il est donc possible de moduler les processus de développement en contrôlant l'activité d'un seul régulateur du développement.

Comment alors arriver à identifier chez les conifères les régulateurs du développement sous-jacent à l'embryogenèse somatique? L'approche que nous avons adoptée consiste à tabler sur nos connaissances de la plante modèle *Arabidopsis*, en partant du principe que les processus génétiques régissant le développement cellulaire chez les conifères sont similaires. Dans le cadre d'un projet de recherche antérieur, mon groupe a étudié la fonction des régulateurs du développement contrôlant la formation des cônes et a mis en évidence un degré élevé de similitude fonctionnelle avec les gènes qui régulent le développement des fleurs chez *Arabidopsis*. Il semblait donc probable que les gènes précédemment découverts et intervenant dans l'embryogenèse somatique chez *Arabidopsis* seraient également présents chez l'épinette — et c'est en effet ce que nous avons découvert.

Notre recherche a par la suite débouché sur l'identification et l'isolement de plusieurs homologues de gènes putatifs de conifères associés à l'induction de l'embryogenèse somatique chez *Arabidopsis*. Nous menons actuellement des essais fonctionnels avec ces homologues de gènes, principalement dans le but de déterminer comment ces gènes peuvent être manipulés pour mieux comprendre l'embryogenèse somatique chez les conifères en général ainsi que pour savoir s'ils peuvent servir à induire l'embryogenèse somatique dans des tissus d'épinettes adultes.

Nathalie Isabel dirige un autre projet de recherche important concernant les facteurs de transcription. Celui-ci est fondé sur la possibilité que la majeure partie de la variation naturelle que présentent la croissance et la qualité du bois des conifères soit liée à une variation au sein des facteurs de transcription qui régulent ces processus de développement. Isabel utilise principalement la génomique structurale, qui consiste à cartographier les chromosomes de diverses essences de conifères. Ces cartes du génome sont maintenant utilisées pour étudier la variation génétique naturelle d'un grand nombre de facteurs de transcription des conifères, dans le but de corréler des types précis de variation à des caractères d'élite. Une fois identifiés, ces facteurs de transcription pourraient servir de marqueurs génétiques pour accélérer l'amélioration des conifères par le biais de la sélection classique.

Approche protéomique pour étudier les interactions arbre forestier–pathogène

Abul K.M. Ekramoddoullah | Centre de foresterie du Pacifique, Service canadien des forêts, Ressources naturelles Canada, Victoria (Colombie-Britannique)

Dans cette présentation, je vais expliquer comment mon équipe de recherche a utilisé l'approche protéomique pour étudier l'interaction arbre-pathogène. Exception faite des organismes nuisibles exotiques introduits dans l'environnement, les maladies et les insectes ravageurs des arbres sont des composantes naturelles des écosystèmes forestiers. Il n'en reste pas moins que les dommages qu'ils causent aux forêts peuvent avoir de graves conséquences économiques. En Colombie-Britannique, ces dommages entraînent des pertes de croissance annuelle estimées à 18 %. Les experts provinciaux et fédéraux ont par conséquent défini certains domaines prioritaires de recherche en Colombie-Britannique, y compris les maladies des racines, comme le pourridié-agaric (*Armillaria* sp.), la carie rouge alvéolaire du pied (*Inonotus tomentosus*) et la carie jaune annelée (*Phellinus weirii*), les rouilles des tiges, comme la rouille vésiculeuse du pin blanc (*Cronartium ribicola*) et la rouille-tumeur autonome (*Endocronartium harknessii*), et des insectes, comme le dendroctone du pin ponderosa (*Dendroctonus ponderosae*), les tordeuses des bourgeons de l'épinette (*Choristoneura fumiferana* et *C. occidentalis*) et des scolytes (Scolytidés).

Les dommages infligés aux conifères par des maladies et des insectes ravageurs prennent diverses formes. Chez le douglas (*Pseudotsuga menziesii*), la pourriture causée par la carie jaune annelée se propage d'un arbre à un autre par contact racinaire. Les forêts verdoyantes de conifères virent au rouge sous l'effet des attaques du dendroctone du pin ponderosa. La rouille vésiculeuse du pin blanc, une maladie introduite en Amérique du Nord au début du 20e siècle, provoque l'apparition de chancres sur les tiges du pin argenté (*Pinus monticola*), et c'est la raison pour laquelle cette essence n'avait pas été plantée jusque tout récemment. Les chercheurs tentent donc de trouver des moyens d'accroître la résistance des conifères aux organismes nuisibles. À cette fin, mon équipe de recherche a effectué des analyses moléculaires des interactions arbre-pathogène dont l'objectif principal était d'identifier les gènes qui améliorent la résistance génétique aux organismes nuisibles. Nous avons choisi la protéomique comme approche principale.

La protéomique est l'étude du profil protéique total d'un organisme ou d'un tissu donné. Même avant que le terme « protéomique » soit inventé, je m'intéressais de près à l'étude du protéome de la rouille vésiculeuse du pin blanc. Les chercheurs en protéomique utilisent l'électrophorèse bidimensionnelle sur gel pour séparer les protéines d'un tissu donné en fonction de leur taille et de leur charge. Ils peuvent ainsi séparer des milliers de protéines. Ils utilisent ensuite un logiciel pour analyser les protéines et distinguer leur profil. Lors de l'étude des organismes nuisibles aux arbres forestiers, ces profils permettent aux chercheurs de distinguer les arbres résistants des arbres sensibles. Les protéines qui s'avèrent uniques à des arbres résistants sont extraites des gels et digérées à l'aide d'enzymes protéolytiques, comme la trypsine, pour obtenir des fragments peptidiques. Les produits de la digestion protéolytique sont analysés par spectrométrie de masse en tandem MALDI (désorption-ionisation par impact laser assistée par matrice). Les bases de données répertoriant les protéines connues sont ensuite fouillées, et les fragments de peptides obtenus sont comparés pour les apparier. Si la recherche est infructueuse, comme c'est souvent le cas avec les protéines de conifères, les fragments de peptides sont refragmentés, puis la séquence d'acides aminés correspondante est déterminée. Cette information permet d'élaborer des amorces PCR (réaction en chaîne de la polymérase) pour cloner le gène encodant la protéine, puis d'utiliser la sonde moléculaire comme marqueur d'ADN pour sélectionner les arbres dotés d'une résistance. Une autre solution consiste à utiliser l'information sur la séquence d'acides aminés pour synthétiser le peptide et produire un anticorps, puis à observer l'expression des protéines pour déterminer son rôle dans la résistance de l'arbre.

Dans le modèle de pathosystème de la rouille vésiculeuse du pin blanc, l'analyse protéomique a révélé à la fois une amplification et une suppression de la biosynthèse protéique chez les arbres résistants après une infection par le pathogène de la rouille. En revanche, seule une suppression de la biosynthèse protéique s'est produite chez les sujets sensibles infectés. Parmi nos découvertes importantes figurent plusieurs protéines liées à la pathogenèse et appartenant aux groupes PR-3, PR-5 et PR-10 chez les conifères. Nous avons trouvé un peptide antifongique (PmAMP1) et une protéine PR-3 associés à un type de résistance se manifestant par une croissance lente des chancres (voir ci-dessous). Nous avons également découvert deux protéines fongiques, l'une agissant comme un éliciteur (provoquant une réaction de défense) et l'autre, comme une protéine de choc thermique (accroît son activité lorsque les cellules qui la contiennent sont échauffées).

Les protéines de la famille PR-3 sont également connues sous le nom de « chitinases ». Ces enzymes dégradent la chitine qui est une composante de la paroi cellulaire des champignons et de la cuticule des insectes. Nous avons identifié trois chitinases, l'une chez le douglas et les deux autres chez le pin argenté. Dans l'un et l'autre pathosystèmes, elles sont régulées à la hausse[1] après l'infection. Chez des douglas infectés par des pathogènes des racines, nous avons observé une accumulation de chitinase dans les aiguilles. Nous avons extrapolé ces constatations à l'échelle du peuplement et du paysage afin de prévoir la perte de croissance des arbres et de productivité. Fait intéressant, la chitinase inhibe la croissance des cristaux de glace lors du gel et agit donc ainsi comme une protéine antigel qui protège les arbres durant les mois d'hiver.

1. C'est-à-dire que leur expression est amplifiée à la suite de l'infection par le pathogène.

Chez le pin argenté, les chancres se résorbent parfois et leur pourtour devient rétracté; c'est le signe d'une forme connue de résistance qui se manifeste par une croissance lente des chancres. Mon collaborateur du Centre de foresterie du Pacifique du Service canadien des forêts, Rich Hunt, a sélectionné des sujets de pin argenté pour ce type de résistance, et des arbres présentant cette résistance sont maintenant utilisés par le programme d'amélioration génétique de la Colombie-Britannique. Une telle sélection prend habituellement six ou sept ans. Maintenant que nous connaissons deux marqueurs moléculaires de ce type de résistance (PR-3 et PmAMP1), le temps de sélection pourrait être ramené à quelques mois. Lorsque nous avons analysé des tissus d'arbres à l'aide du transfert de Western ou technique de l'immunoempreinte (une technique de détection des protéines à l'aide d'anticorps spécifiques), nous avons constaté que ceux provenant d'arbres résistants (à chancres à croissance lente) avaient deux bandes de chitinase PR-3, tandis que les arbres sensibles n'en avaient qu'une seule. Une analyse de ségrégation en mélange a révélé que le gène encodant la chitinase PR-3 n'est présent que chez les sujets résistants. Ces derniers présentaient également une concentration beaucoup plus élevée du peptide antifongique PmAMP1 que les sujets sensibles; nous avons préparé une affiche à ce sujet.

Nous avons également observé une accumulation beaucoup plus importante d'une protéine PR-10 à la suite d'une infection fongique chez un arbre porteur d'un gène de résistance dominant et nous avons utilisé des techniques immunochimiques pour étudier l'activité de cette protéine. Nous avons prélevé des coupes transversales dans le tissu d'aiguilles de pins argentés infectés et nous les avons sondées à l'aide de particules d'or marquées avec des anticorps PR-10. Nous avons ensuite examiné le tissu au microscope électronique. Chez les cellules de pin blanc infectées et qui renfermaient, par conséquent, des cellules fongiques, la plupart des particules d'or étaient fixées à la paroi cellulaire, une constatation qui montre que cette protéine fixe le champignon, puisqu'il s'agit du point d'entrée du champignon dans la cellule. À ma connaissance, c'est la première fois qu'il est démontré qu'une protéine PR-10 fixe un pathogène.

Fait intéressant, cette protéine PR-10 est régulée à la hausse durant les mois d'hiver. Rich Hunt a montré que des pins argentés résistants à la rouille vésiculeuse et poussant en altitude devenaient sensibles à ce pathogène lorsqu'ils étaient transplantés à basse altitude. De façon similaire, des sujets résistants de l'intérieur de la Colombie-Britannique devenaient sensibles au pathogène lorsqu'ils étaient transplantés sur la côte. Ces résultats laissent supposer que de basses températures aident les arbres à produire des protéines de défense. En prime, nous avons découvert que la protéine peut servir de marqueur de la résistance au gel et que les arbres les plus résistants au gel ont également une concentration plus élevée de cette protéine. Nous avons inséré le gène PR-10 dans des sujet des plantes modèles *Arabidopsis* et canola, une importante plante cultivée, pour voir si ce gène confère une résistance au gel chez ces végétaux. Les deux plantes transgéniques ont exprimé des protéines PR-10 du conifère, lesquelles ont rendu les sujets transgéniques d'*Arabidopsis* résistants au gel. Le canola fait actuellement l'objet d'essais similaires.

Les protéines PR-10 sont encodées par une famille multigénique; chez le seul pin argenté, nous avons identifié 19 membres de cette famille. L'expression de chaque gène est sous le contrôle de son propre promoteur. Au fil de l'évolution des conifères, cette famille multigénique s'est diversifiée et s'est peut-être appropriée diverses fonctions. Nous avons caractérisé deux promoteurs du gène PR-10, le premier spécifique aux racines et le second, induit par un pathogène ou une blessure. La fonction de ces promoteurs est d'exprimer le gène d'intérêt dans un tissu particulier et ce, seulement en présence d'une menace d'invasion par un insecte ou un pathogène. Nous avons caractérisé certains éléments *cis*-régulateurs[2] chez un promoteur du gène PR-10 : une boîte G[3] intervenant dans l'expression d'une réaction à une blessure, des éléments régulateurs du froid, une structure palindromique qui pourrait servir de site de liaison à des facteurs de transcription, des éléments stimulants de l'éliciteur, un site de liaison pour un facteur de transcription bien connu pouvant activer l'éliciteur fongique, un motif CGTCA (cytosine–guanine–thymine–cytosine–adénine) intervenant dans l'activation de MeJ (méthyl épi-jasmonate) et un élément sensible à l'éthylène.

Nous avons identifié un gène dominant de résistance (*R*) à la rouille vésiculeuse chez un pin argenté issu du programme d'amélioration de l'État de l'Oregon. Nous avons testé le gène *R* sur des isolats de la rouille de la Colombie-Britannique et nous avons confirmé son efficacité contre la forme de rouille de cet endroit. Par conséquent, les arbres utilisés dans le cadre du programme d'amélioration du pin argenté de la Colombie-Britannique sont maintenant sélectionnés pour le gène *R*. Les arbres porteurs du gène *R* affichent une réaction d'hypersensibilité (RH) suite à une infection par la rouille vésiculeuse : la RH survient lorsque les cellules produites par l'hôte pour compartimenter le pathogène en réaction à l'invasion meurent soudainement, ce qui finit par éliminer le champignon. L'éliciteur isolé chez la rouille vésiculeuse du pin blanc dont j'ai parlé précédemment peut imiter cette RH.

Un modèle biochimique nous a permis de prévoir que le produit génique non virulent du pathogène (vraisemblablement, l'éliciteur) serait directement ou indirectement reconnu par le produit du gène *R* de l'hôte, ce qui, à son tour, activerait une voie de transduction du signal qui finirait par activer des protéines liées à la défense de l'hôte dont l'action combinée donne lieu à la RH. Nous avons identifié chez le pin argenté certains éléments du promoteur qui nous permettront de caractériser certains facteurs de transcription et d'identifier ainsi les gènes régulateurs. Nous nous employons actuellement à isoler le gène *R* et son produit chez le pin argenté. Pour l'heure, 40 gènes *R* ont été clonés chez divers végétaux. Les séquences déduites de protéines qu'ils encodent présentent plusieurs motifs communs, par exemple, des sites de liaison des nucléotides, une glissière à leucine, une répétition riche en leucines et un récepteur toll

2. Éléments régulateurs qui ne s'activent que lorsqu'ils se fixent physiquement à la cible de la régulation.
3. Composante de l'ARN messager qui fixe les purines pour réguler le métabolisme et le transport des purines.

et interleukine. Nous avons utilisé ces motifs communs pour concevoir des amorces PCR et amplifier des analogues des gènes de résistance (AGR) du pin argenté. Jusqu'à maintenant, nous avons isolé 120 AGR et avons établi la séquence génomique complète de quatre d'entre eux et la séquence d'ADNc (ADN complémentaire) de deux d'entre eux. Nous mettons actuellement au point un anticorps pour détecter les protéines *R* correspondantes.

Nous utilisons la stratégie suivante pour isoler le gène *R*. Nous avons fait germer des graines porteuses de gènes *R* dominants, puis nous avons exposé les semis ainsi obtenus à la rouille vésiculeuse du pin blanc. Nous évaluons actuellement, à partir du phénotype, si les semis sont résistants ou sensibles au champignon. Simultanément, nous appliquons la PCR à l'ADN de mégagamétophytes provenant de graines correspondantes en utilisant les AGR comme amorces. Nous utiliserons les produits PCR entiers pour établir la carte génétique primaire. Les résultats de ces deux études parallèles nous aideront à faire le lien entre les AGR et le gène *R*. Si l'intervalle entre les AGR et le gène *R* est relativement faible, nous utiliserons le clonage positionnel pour les évaluer; dans le cas contraire, nous utiliserons des plants transgéniques de tabac porteurs du gène de l'éliciteur fongique pour étudier leur interaction avec un éliciteur dérivé de la rouille vésiculeuse et les évaluer.

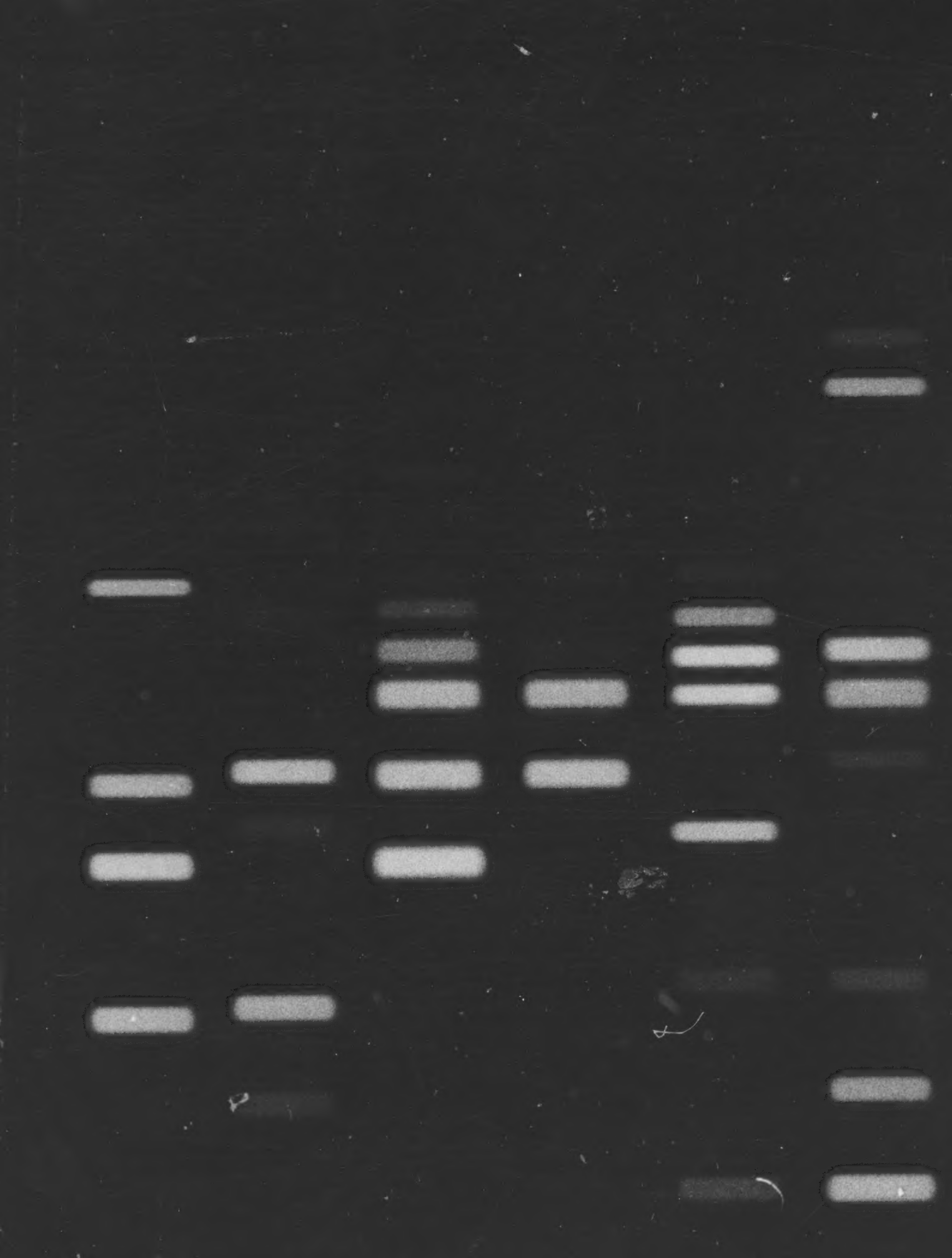
Enfin, nous avons synthétisé un anticorps monoclonal de la protéine de choc thermique que nous avons découverte. Pour y arriver, nous avons transformé une molécule d'anticorps de 150 kDa (kilodalton)[4] en un anticorps simple chaîne de 28 kDa qui a conservé sa capacité de fixation des protéines. Nous prévoyons introduire le gène de cet anticorps simple chaîne chez des pins argentés sensibles à l'infection par la rouille vésiculeuse. L'anticorps désactivera la protéine fongique, ralentissant ainsi la croissance du champignon et permettant aux mécanismes de défense de l'arbre de prendre le relais.

Parmi nos axes de recherche futurs, mentionnons la recherche de protéines antifongiques chez les conifères, l'isolement et la caractérisation de facteurs de transcription utiles à la régulation des gènes en amont de la cascade de signaux — nos travaux de caractérisation du promoteur nous donnant une longueur d'avance — et, à terme, l'obtention d'arbres dotés de mécanismes de défense multicouche grâce à l'exploitation de promoteurs de gènes dérivés de conifères.

Parmi nos partenaires, collaborateurs et clients de ce projet de recherche, j'aimerais souligner l'apport du ministère des Forêts de la Colombie-Britannique, de Canfor, de TimberWest, de l'Alberta Research Council, notamment ses travaux sur le canola transgénique, ainsi que de Barbara Hawkins, de la University of Victoria, pour ses essais sur la résistance au gel.

4. Un dalton est une unité de masse utilisée en biologie moléculaire, correspondant à la masse d'un atome d'hydrogène, soit 1 Da.

GÉNOMIQUE DES INSECTES RAVAGEURS ET DES AGENTS ENTOMOPATHOGÈNES



Apport de la recherche canadienne aux projets internationaux sur les insectes ravageurs et les agents entomopathogènes

Présentation liminaire Peter Krell | Département de biologie moléculaire et cellulaire, University of Guelph, Guelph (Ontario)

C'est avec plaisir que je souligne le rayonnement du Canada sur la scène internationale dans le domaine des insectes forestiers ravageurs et des agents entomopathogènes. Durant les années 1950, un laboratoire de recherche en pathologie des insectes a été construit au Centre de foresterie des Grands Lacs (CFGL) (Service canadien des forêts [SCF], Ressources naturelles Canada [RNCan]) de Sault Ste. Marie (Ontario) afin d'étudier les agents pathogènes microbiens. Depuis ce temps, le Canada est un chef de file mondial de la recherche sur les ravageurs forestiers. Les chercheurs canadiens dans ce domaine ont collaboré avec de nombreux pays, et mon exposé d'aujourd'hui en présentera quelques exemples. Je décrirai brièvement les recherches effectuées par huit scientifiques canadiens connus, dont je suis, œuvrant dans des laboratoires universitaires et gouvernementaux. En guise de conclusion, je donnerai un aperçu de la contribution, à l'échelon international, des scientifiques canadiens aux questions de gouvernance, de leur participation à des comités de rédaction et des réalisations qui leur ont valu leur renommée dans le domaine de la génomique des insectes ravageurs et de leurs agents pathogènes.

Basil Arif du CFGL participe à des projets internationaux en Chine, en Allemagne, au Brésil et aux États-Unis. Ses travaux de recherche les plus récents portent sur la génomique, la phylogenèse et l'évolution de trois baculovirus[1] d'intérêt pour le Canada. L'un de ces derniers, le nucléopolyhédrovirus du *Neodiprion lecontei* (NeleNPV), est très efficace contre le diprion de LeConte (*Neodiprion lecontei*), un insecte qui attaque et défolie les pins des plantations. Grâce à une méthode de génomique, Basil Arif et ses collègues ont établi que le NeleNPV correspondait à un virus ancestral très semblable au nucléopolyhédrovirus du *N. sertifer* (NeseNPV), qui agit contre un ravageur différent, le diprion du pin sylvestre (*N. sertifer*) (Lauzon *et al.*, 2004).

Eric Carstens de la Queen's University, à Kingston (Ontario), travaille en collaboration avec des collègues d'Allemagne, de Chine et de France. Il s'intéresse au complexe de réplication de l'ADN des baculovirus, notamment de l'espèce type du nucléopolyhédrovirus d'*Autographa californica* (AcMNPV). Il a établi les profils d'expression temporelle de la synthèse de quatre protéines virales (IE-0, IE-1, P143 et LEF-3) qui joueraient un rôle dans la réplication de l'ADN viral, qui se produit au dernier stade de l'infection de la cellule hôte par un virus. Il a fait la preuve que ces quatre protéines sont disponibles avant la réplication de l'ADN et qu'elles pourraient donc être théoriquement disponibles pour produire un réplicon[2] d'une molécule d'ADN (Ito *et al.*, 2004).

De mon côté, je collabore avec des chercheurs d'Espagne, des Pays-Bas, de la Chine, de l'Afrique du Sud, de l'Allemagne et des États-Unis. Tout comme Basil Arif et Eric Carstens, je m'intéresse au génome des virus, à la phylogenèse des gènes et du génome des virus ainsi qu'à l'évolution des virus. J'ai fait la preuve que la phylogenèse du facteur d'expression tardif *lef-2* (gène participant à la réplication de l'ADN viral) correspond dans une certaine mesure à son emplacement sur les génomes respectifs de différents baculovirus. Ainsi, la séquence du *lef-2* du baculovirus de la tordeuse des bourgeons de l'épinette (*Choristoneura fumiferana*), le CfMNPV, forme une grappe avec sept autres nucléopolyhédrovirus du groupe I, et la localisation relative de ce gène dans le génome est maintenue chez ces virus. Toutefois, dans une autre grappe phylogénétique, la localisation du gène *lef-2* dans le génome varie d'un virus à l'autre. Ces constatations m'ont permis d'arriver à la conclusion que la localisation relative d'un gène de baculovirus dans le génome ainsi que la phylogenèse du génome peuvent servir à établir par inférence l'évolution d'un baculovirus (Chen *et al.*, 1999). Grâce à l'étude sur le terrain d'échantillons sauvages de nucléopolyhédrovirus du *Spodoptera exigua* (SeNPV), mes collègues espagnols et moi-même avons montré qu'ils contenaient un mélange de génotypes, nous permettant de supposer qu'il existe une certaine synergie entre les différents génotypes (Muñoz *et al.*, 1999).

Je m'intéresse aussi à la fonction de certains des cadres ouverts de lecture que la génomique a permis d'identifier, y compris le gène *me-53* du nucléopolyhédrovirus du *Trichoplusia ni single* (TnSNPV) et le gène *Cf103* du virus CfMNPV. Ces deux gènes codent pour une protéine en doigt de zinc[3], un signe qu'ils pourraient agir comme facteur de transcription. Puisque la réplication des virus dépend de la sensibilité de l'hôte, il est probable que les virus ont coévolué avec leurs hôtes. J'ai souvent discuté de ce sujet avec Johannes Jehle, un collègue allemand.

Outre les agents entomopathogènes, je m'intéresse également à la biologie moléculaire des insectes, notamment dans le but de comprendre le développement des insectes et le rôle des hormones de mue dans l'activation génique. En collaboration avec Arthur Retnakaran et Qili Feng, des collègues du CFGL, j'ai notamment fait la preuve que le niveau d'ecdysone (l'hormone de mue) présentait un pic avant la nymphose. Le récepteur hormonal 3 (HR3) du facteur de transcription est activé, ce qui initie probablement une cascade de transcriptions géniques aboutissant à la nymphose. Mon équipe de recherche, en étroite collaboration avec des chercheurs d'Israël et de la société

1. Virus infectant des arthropodes spécifiques, presque exclusivement des insectes.
2. Unité de réplication formée par une molécule d'ADN pouvant se répliquer de façon autonome dans une cellule, comme un chromosome de virus.
3. Éléments répétitifs avec une forme de doigt de gant, repliés autour d'un atome de zinc, présents chez certaines protéines et interagissant avec l'ADN.

Rohm and Haas des États-Unis, a découvert qu'un analogue de l'ecdysone, le RH-5992, induit la transcription du récepteur hormonal CHR3 chez la tordeuse des bourgeons de l'épinette mais non pas de l'équivalent DHR3 chez la drosophile. Cet analogue de l'ecdysone a donc une action spécifique sur les lépidoptères (papillons diurnes et nocturnes) et est sans effet sur les diptères (mouches) (Retnakaran *et al.*, 2001).

Michel Cusson du Centre de foresterie des Laurentides (SCF, RNCan) de Québec travaille avec des collègues des États-Unis, de Belgique et du Burkina Faso. L'un de ses projets porte sur un ichnovirus transmis par une guêpe parasitoïde. Les ichnovirus sont des virus symbiotiques spécifiques des Ichneumonidae, une famille de guêpes; ils codent pour des protéines qui anéantissent les mécanismes de défense des guêpes et bloquent la métamorphose de leurs larves. Michel Cusson vise à identifier les gènes viraux associés à la suppression des mécanismes de défense de l'insecte afin de pouvoir les introduire dans des baculovirus vecteurs et d'améliorer leur utilité comme agents de lutte biologique (Béliveau *et al.*, 2003). Il étudie également la thermorégulation chez les insectes; il a découvert que les sauterelles peuvent se défendre contre les attaques de champignons en élevant leur propre température grâce à un processus de thermorégulation, ce qui réduit ainsi la capacité de réplication des champignons et les empêche de s'établir. De plus, Michel Cusson a utilisé la protéomique pour déterminer la structure tridimensionnelle d'une protéine (la farnésyl diphosphate synthase ou FPPS) intervenant dans la production de l'hormone juvénile chez les lépidoptères. Il a fait la preuve que les composantes structurelles de la protéine étaient maintenues chez un large éventail de lépidoptères (Ouedraogo *et al.*, 2003).

En collaboration avec des collègues américains, **David Theilmann**, du Centre de recherches agroalimentaires du Pacifique (Agriculture et Agroalimentaire Canada) de Summerland (Colombie-Britannique), s'intéresse à la régulation transcriptionnelle et à la fonction de gènes de baculovirus. Ainsi, il a mis au point un commutateur génique pour l'induction de l'expression des gènes basé sur un élément de réponse au récepteur de l'ecdysone (EcR) (Dai *et al.*, 2005). Ses premiers essais portant sur l'expression du gène de la chloramphénicol acétyl transférase (CAT) ont montré que l'induction du gène est fortement régulée par le niveau d'ecdysone ajouté. De plus, les analogues de l'ecdysone, comme le RG-102240, assurent une induction à long terme de l'expression du gène CAT. Le CAT est une enzyme bactérienne qui inactive l'antibiotique chloramphénicol. Ces analogues de l'ecdysone pourraient donc être utilisés dans une thérapie génique pour activer des gènes dans des systèmes d'expression mammaliens. Pour étudier la fonction de gènes, David Theilmann s'est également servi de la technique d'« inactivation » de gènes pour démontrer le rôle essentiel que joue le gène baculoviral *pe38* dans la réplication de l'ADN et la production de virus (Maynard *et al.*, 2003).

Jean-Louis Schwartz et **Raynald Laprade** de l'Université de Montréal (Québec) effectuent des recherches sur la Cry1Ac, une toxine Cry (en forme de cristal) produite par la bactérie *Bacillus thuringiensis* et efficace contre des insectes ravageurs. Ils ont collaboré à des projets nationaux et internationaux de grande envergure, y compris avec des laboratoires d'Autriche, d'Italie, de Thaïlande, de France, des États-Unis et du Royaume-Uni. Dans le cadre de leurs recherches, ils ont utilisé la microscopie à force atomique et d'autres techniques pour établir que la Cry1Ac est tétramérique. Ils ont montré que lorsque la toxine est insérée dans une cellule d'insecte, sa structure entraîne la formation d'un pore dans la membrane cellulaire par où les ions s'échappent, entraînant un déséquilibre électrolytique (Peyronnet *et al.*, 2002).

Qili Feng du CFGL a participé à un projet d'envergure sur le séquençage du génome avec des collègues de la Chine et du Japon. Ses recherches visaient le génome d'un grand défoliateur des forêts du Canada, la tordeuse des bourgeons de l'épinette. À partir de la lecture de 35 000 séquences EST (étiquettes de séquences exprimées), il a pu identifier 9 574 gènes distincts de la tordeuse des bourgeons de l'épinette, soit environ 1,2 % de son génome. La base de données génomiques issue de ses travaux fournit maintenant des pistes pour élaborer des insecticides spécifiques efficaces. Combinée aux bases de données génomiques sur d'autres insectes comme la drosophile et la pyrale du maïs (*Ostrinia nubilalis*), elle peut permettre d'inférer la phylogenèse de l'insecte. En collaboration avec d'autres collègues des États-Unis et de l'Allemagne, Qili Feng a décortiqué l'élément de réponse de l'hormone juvénile et a établi la phylogenèse des séquences des protéines ribosomales de l'insecte (Kethidi *et al.*, 2004).

Je vais maintenant donner un aperçu du rôle consultatif et administratif que joue le Canada à l'échelon international dans le domaine des insectes ravageurs et des agents entomopathogènes. Le Réseau Biocontrôle est un consortium pancanadien réunissant 42 chercheurs. Il est dirigé depuis Montréal par Raynald Laprade et Jean-Louis Schwartz et est financé par le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG). Il a pour mission de réduire l'utilisation des pesticides chimiques en mettant au point de nouvelles méthodes de lutte biologiques et sans danger pour l'environnement. Il est officiellement affilié à divers organismes internationaux de recherches, comme CAB International (CABI), l'Organisation internationale de lutte biologique contre les animaux et les plantes nuisibles (OILB), la Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation (CSIRO) d'Australie, l'European Biological Control Laboratory (EBCL), l'Institut national de la recherche agronomique (INRA) et le Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement (CIRAD) de France et le National Integrated Pest Management (IPM) Network et le département de l'Agriculture (USDA) des États-Unis. Ces affiliations ont permis d'instaurer plus facilement des collaborations internationales en matière de recherche et de tenir des ateliers à l'intention des membres du réseau.

De nombreux chercheurs canadiens font partie, à la direction ou dans les comités, d'organismes internationaux de gouvernance comme le Comité international de taxonomie des virus (CITV), la Society for Invertebrate Pathology (SIP) et l'Union

internationale des sociétés de microbiologie (UISM). Ainsi, trois Canadiens occupent un poste de direction ou président un comité du CITV, un organisme s'occupant des questions taxinomiques de la nomenclature des virus, et effectuent notamment des examens approfondis de nouvelles propositions et la révision des taxons au besoin. La SIP, une organisation internationale vouée à l'étude des agents pathogènes des insectes et d'autres invertébrés, a été au départ créée par des Canadiens; au cours des dernières années, plusieurs Canadiens y ont occupé des postes de direction ou y ont présidé des réunions ou des comités de division.

Certains scientifiques canadiens sont directeurs de la rédaction ou membres des comités de rédaction de revues scientifiques internationales dans des domaines comme la biologie et la pathologie des invertébrés et sont donc chargés d'examiner les textes à publier. Ainsi, des Canadiens occupent des postes de rédacteurs en chef de revues comme la *Biocontrol Science and Technology*, *Biological Control* et le *Journal of Invertebrate Pathology*.

À l'échelon international, les chercheurs canadiens ont énormément contribué à l'étude des virus des insectes, notamment dans le domaine de la génomique des baculovirus. Des 24 séquences complètes du génome de baculovirus dont font état des publications scientifiques et qui ont été déposées auprès de la GenBank, une base de données internationale où sont stockées les séquences d'ADN, 5 ont été établies dans le cadre d'un projet de recherche dirigé par des Canadiens et 6 autres, dans le cadre d'un projet de recherche auquel collaboraient des Canadiens, ce qui représente près de la moitié des séquences de baculovirus actuellement disponibles.

Les chercheurs du monde entier tiennent leurs collègues canadiens en haute estime et ces derniers participent souvent à des échanges ou des débats animés lors de réunions. Ainsi, lors d'une discussion animée, David Theilmann a présenté ses arguments en faveur d'une phylogenèse révisée des baculovirus à des collègues d'Israël, des Pays-Bas, de la Chine et de l'Allemagne. Qui plus est, des chercheurs canadiens ont joué un rôle de premier plan lors de la réunion de la SIP qui s'est tenue à Helsinki, en Finlande, en août [2004].

Pour conclure mon exposé, permettez-moi de réaffirmer que le Canada est bel et bien un acteur international de la recherche sur les insectes ravageurs et les agents entomopathogènes et de vous remercier de m'avoir donné l'occasion de souligner les réalisations des chercheurs canadiens dans ce domaine.

Bibliographie

Béliveau, C.; Levasseur, A.; Stoltz, D.; Cusson, M. 2003. Three related TrIV genes: comparative sequence analysis and expression in host larvae and Cf-124T cells. J. Insect Physiol. 49: 501–511.

Chen, X.; Ijkel, W.F.J.; Dominy, C.; de Andrade Zanotto, P.M.; Hashimoto, Y.; Faktor, O.; Hayakawa, T.; Wang, C.-H.; Prekumar, A.; Mathavan, S.; Krell, P.J.; Hu, Z.; Vlak, J.M.1999. Identification, sequence analysis and phylogeny of the *lef-2* gene of *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid baculovirus. Virus Res. 65:21–32.

Dai, X.; Willis, L.G.; Palli, S.R.; Theilmann, D.A. 2005. Tight transcriptional regulation of foreign genes in insect cells using an ecdysone receptor-based inducible system. Protein Expr. Purif. 42:236–245.

Ito, E.; Sahri, D.; Knippers, R.; Carstens, E.B. 2004. Baculovirus proteins IE-1, LEF-3, and P143 interact with DNA in vivo: a formaldehyde cross-linking study. Virology 329:337–347.

Kethidi, D.R.; Perera, S.C.; Zheng, S.; Feng, Q.-L.; Krell, P.; Retnakaran, A.; Palli, S.R. 2004. Identification and characterization of a juvenile hormone (JH) response region in the JH esterase gene from the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. J. Biol. Chem. 279:19634–19642.

Lauzon, H.A.M.; Lucarotti, C.J.; Krell, P.J.; Feng, Q.; Retnakaran, A; Arif, B.M. 2004. Sequence and organization of the *Neodiprion lecontei* nucleopolyhedrovirus genome. J. Virol. 78:7023–7035.

Milks, M.L.; Washburn, J.O.; Willis, L.G.; Volkman, L.E.; Theilmann, D.A. 2003. Deletion of *pe38* attenuates AcMNPV genome replication, budded virus production, and virulence in *Heliothis virescens*. Virology 310:224–234.

Muñoz, D.; Murillo, R.; Krell, P.J.; Vlak, J.M.; Caballero, P. 1999. Four genotypic variants of a *Spodoptera exigua Nucleopolyhedrovirus* (Se-SP2) are distinguishable by a hypervariable genomic region. Virus Res. 59:61–74.

Ouedraogo, R.M.; Cusson, M.; Goettel, M.S.; Brodeur, J. 2003. Inhibition of fungal growth in thermoregulating locusts, *Locusta migratoria*, infected by the fungus *Metarhizium anisopliae* var *acridum*. J. Invertebr. Pathol. 82:103–109.

Peyronnet, O.; Nieman, B.; Généreux, F.; Vachon, V.; Laprade, R.; Schwartz, J.-L. 2002. Estimation of the radius of the pores formed by the *Bacillus thuringiensis* Cry1C ∂-endotoxin in planar lipid bilayers. Biochim. Biphys. Acta — Biomem. 1567:113–122.

Retnakaran, A.; Gelbic, I.; Sundaram, M.; Tomkins, W.; Ladd, T.; Primavera, M.; Feng, Q.; Arif, B.; Palli, R.; Krell, P. 2001. Mode of action of the ecdysone agonist tebufenozide (RH-5992), and an exclusion mechanism to explain resistance to it. Pest Manag. Sci. 57:951–957.

Génomique de la tordeuse des bourgeons de l'épinette et de ses virus pathogènes, et recherche de molécules bioactives dérivées

Basil Arif | Centre de foresterie des Grands Lacs, Service canadien des forêts, Ressources naturelles Canada, Sault Ste. Marie (Ontario)

Mon exposé va vous donner un aperçu du programme financé par l'Institut de génomique de l'Ontario (IGO) et concernant la génomique de la tordeuse des bourgeons de l'épinette et de ses virus pathogènes ainsi que des retombées bénéfiques actuelles et potentielles de cette recherche.

Au cours des dernières décennies, la tordeuse des bourgeons de l'épinette (*Choristoneura fumiferana*) a été l'insecte le plus dévastateur des forêts du Canada, causant des pertes de bois marchand se chiffrant à des milliards de dollars. Les insectes et les virus ont coévolué pour s'adapter aux exigences de la physiologie larvaire complexe et de la réplication virale. Au fil de leur évolution, les virus ont eu tendance à devenir des parasites atténués, ce qui a abouti à une relation insecte-virus complexe qui rend l'étude de cette niche écologique particulière très intéressante. Avec l'avènement de la technologie génétique, il est devenu possible de modifier les virus et d'améliorer leur efficacité contre un insecte ravageur donné dans le respect de l'environnement. Cependant, la modification du génome d'un virus ne peut être effectuée qu'à l'issue d'un examen approfondi de l'efficacité d'un tel changement et de ses effets sur la spécificité et la gamme d'hôtes, sur les organismes non visés et sur d'autres aspects liés aux risques pour l'environnement. Comme dans de nombreux autres domaines, la génomique et la protéomique semblent détenir la clé pour déchiffrer la constitution précise d'un organisme, qu'il s'agisse de l'homme, d'un insecte ou d'un virus, et fournir aux chercheurs les outils nécessaires pour lutter plus efficacement contre les infestations.

Au Centre de foresterie des Grands Lacs (CFGL), le programme de génomique structurale et fonctionnelle financé par l'IGO suit deux axes indépendants mais étroitement apparentés sur la génomique des virus et des insectes. Les études sur la génomique des virus consistent à séquencer un certain nombre de génomes viraux, à identifier tous leurs gènes et leurs cadres ouverts de lecture (ORF), à classer les gènes selon leurs profils temporel d'expression et leur fonction et à mettre au point des biopuces pour étudier l'expression génique chez des lignées cellulaires et des larves. De même, dans le cas de la génomique des insectes, un certain nombre de banques d'ADN complémentaire (ADNc) ont été générées à partir de différents tissus larvaires et de divers stades de développement des insectes. Les étiquettes de séquences exprimées (EST) ont été générées à partir de cette banque, puis les gènes ont été annotés. L'expression génique spécifique et globale est ensuite étudiée à l'aide de certaines technologies disponibles. Les gènes d'insectes qui présentent un intérêt particulier sont ceux intervenant dans la pathogenèse, la gamme et la spécificité des hôtes, la toxicité, la mue, la diapause et la résistance. Ces études déboucheront sur un certain nombre d'applications comme l'obtention d'agents de lutte biologique sans danger pour l'environnement (virus transgéniques), de plantes transgéniques et de produits dérivés comme des systèmes d'expression de protéines exogènes utilisant des insectes ou des virus. Ces études ont déjà permis d'obtenir des virus transgéniques sur lesquels je m'étendrai un peu plus loin.

Pour obtenir des EST de la tordeuse des bourgeons de l'épinette, nous avons construit des banques d'ADNc à partir de cultures tissulaires de larves entières, de l'épiderme, de l'intestin moyen, du corps gras ainsi que de lignées cellulaires de l'intestin. Ces tissus jouent un rôle important : ils sont essentiels à l'interaction virus–insecte ou à la réplication des virus, ou ils sont le siège de la réplication des virus. Les EST sont obtenues à partir des banques d'ADNc, puis séquencées, comparées à l'aide du programme BLAST[1] avec les banques existantes de GenBank[2] et annotées. Les banques sont comparées avec des banques semblables d'autres espèces d'insectes comme le ver à soie (*Bombyx mori*), et les différences entre les insectes selon leur habitat, leur évolution et leurs interactions dans leur milieu respectif sont déterminées. Notre équipe de recherche du CFGL se penchera sur l'expression génique spécifique et globale, puis aura recours à la génomique fonctionnelle et à l'inactivation de gènes. En résumé, les EST serviront au clonage de gènes, à l'expression génique globale, à la construction de cartes physiques, puis à l'annotation et au profilage. Jusqu'à maintenant, plus de 35 000 EST de la tordeuse des bourgeons de l'épinette, obtenues à partir de cinq banques d'ADNc, ont été séquencées. Ces EST contiennent presque 10 000 unigènes qui correspondent à environ 3 000 autres gènes de GenBank.

Qili Feng, qui fait partie de l'équipe du CFGL, a mis sur pied un site Web interactif pour les chercheurs qui veulent fouiller notre base de données sur la tordeuse des bourgeons de l'épinette. L'adresse est la suivante : http://pestgenomics.org/database. htm. Les chercheurs peuvent y entrer leur séquence d'ADN ou un mot clé et fouiller la base de données à la recherche de correspondances. Par exemple, en tapant un mot clé et en sélectionnant l'option « contigs », on peut trouver de l'information sur les fragments d'ADN chevauchants ou contigs, y compris leur localisation et la façon dont ils sont identifiés. La base de données SwissProt identifie une fonction correspondante du gène. On peut également utiliser un lien qui nous amène au site Web du National Center for Biotechnology Information, un centre de documentation sur la biologie moléculaire, basé aux États-Unis, et y approfondir la recherche.

Je vais vous donner un exemple précis de la démarche que je viens de décrire. Chez les insectes, la mue larvaire semble un processus

1. BLAST est un programme informatique qui identifie les gènes homologues chez différents organismes.
2. Une base publique de données des séquences d'ADN qui est tenue à jour par le National Center for Biotechnology Information des National Institutes of Health, à Bethesda (Maryland).

simple comprenant à chaque stade le rejet et le remplacement du tégument. En réalité, ce processus nécessite une régulation détaillée et une coordination du système hormonal et du système métabolique qui se traduisent par une régulation à la hausse ou à la baisse d'un certain nombre de gènes, dont les produits sont indispensables au reste du processus. Certains gènes sont fortement exprimés, d'autres ne le sont pas du tout ou ont un niveau d'expression très faible. Nous avons analysé plus de 2 800 séquences de la tordeuse des bourgeons de l'épinette provenant d'une banque unique. Lorsque nous les avons comparées à l'aide du programme BLAST à d'autres séquences provenant de diverses espèces, y compris l'homme, nous avons obtenu 706 résultats, les meilleurs correspondant à des séquences d'autres lépidoptères. Nous avons assigné des fonctions à un grand nombre de ces gènes lors des stades de l'intermue et de la mue et, fait intéressant, nous avons identifié un pourcentage élevé de gènes codant pour des hydrolases, un groupe d'enzymes qui catalyse certaines liaisons chimiques par fixation d'eau. C'est probablement parce qu'un certain nombre de ces enzymes — chitinases, protéases, cathepsines, etc. — sont nécessaires pour dissoudre et dégrader certains tissus. Il est donc possible d'insérer des gènes codant pour des hydrolases dans un baculovirus ou un poxvirus afin d'améliorer leur efficacité contre un insecte ravageur, en ciblant un tissu d'insecte précis à dégrader.

Nous mettons actuellement au point des biopuces pour analyser l'expression génique chez des larves du sixième stade en voie de se nymphoser. Nous pouvons identifier quels gènes, parmi les plus de 3 000 exprimés, ont été régulés à la hausse et à la baisse. Cette tâche va bon train. Nous espérons étudier de façon plus approfondie l'effet de l'infection virale sur la régulation des gènes dans un tissu larvaire spécifique ainsi que l'effet de ce tissu d'insecte précis sur la régulation génique virale.

Le cycle de réplication du virus dans des cellules sensibles est biphasique, c'est-à-dire qu'il aboutit à deux phénotypes distincts. Ces deux phénotypes ont des signatures protéiques. Pendant les premiers stades de l'infection, le cycle d'infection entraîne la formation de bourgeons qui sont responsables de la propagation du virus dans les tissus larvaires. À des stades d'infection plus avancés, les particules virales sont occluses dans la matrice protéinique. Après la mort de l'insecte, les particules virales occluses sont libérées dans l'environnement où, une fois ingérées, elles infectent d'autres larves. Les génomes des deux phénotypes de virus (bourgeonné et occlus) sont identiques, mais certaines protéines sont destinées à faire partie de la structure de l'un des phénotypes mais non pas de l'autre.

Nous avons séquencé un certain nombre de génomes de virus. La taille du génome de baculovirus varie de 80 000 à 180 000 paires de bases. Un examen des génomes de tous les baculovirus de lépidoptères qui ont été séquencés permet de constater un degré élevé de conservation des gènes, de leur ordre et d'autres caractères structuraux qui interviennent dans diverses fonctions. Une importante caractéristique des baculovirus est la nette division temporelle des classes des gènes dans le génome. Les classes de gènes sont exprimées à divers intervalles après l'infection, selon la protéine ou la fonction particulière dont un virus a besoin. Une importante caractéristique du génome des baculovirus des lépidoptères est la présence de gènes dits auxiliaires qui confèrent au virus un certain avantage sélectif dans la nature mais qui ne sont pas essentiels à la réplication du virus. Ils peuvent donc être délétés du génome et remplacés par un gène exogène codant pour une protéine d'intérêt, par exemple ayant une action plus néfaste sur la larve hôte. L'expression génique chez les baculovirus n'est certainement pas aléatoire. Elle se produit de façon ordonnée, en cascade. Les gènes sont régulés à un moment précis dans le temps; ils sont associés à une expression immédiate précoce, précoce, tardive ou très tardive, correspondant au temps dont l'ADN a besoin pour commencer à se répliquer. Cette constatation est d'une importance capitale : même si le génome du baculovirus est petit, ses gènes sont exprimés de manière ordonnée.

Peter Krell, un chercheur de la University of Guelph qui collabore à notre projet, a utilisé des biopuces pour analyser l'expression génique chez les insectes à divers moments après l'infection virale. Les biopuces permettent de mesurer les concentrations d'ARN messager (ARNm), qui codent et transmettent l'information de l'ADN lors de la transcription. À l'occasion de l'examen de l'expression dans un brin spécifique, Krell a parfois détecté un ARNm provenant du brin opposé, une observation inattendue. Cette constatation pourrait indiquer l'existence chez les baculovirus d'un mécanisme jusque-là inconnu de régulation de l'expression génique que nous pourrons peut-être appliquer à nos travaux sur la réplication virale. Les biopuces sont certes des outils précieux, mais elles ne fournissent qu'un certain ordre de grandeur de l'expression génique; les chercheurs doivent avoir recours à d'autres techniques pour bien comprendre ce processus complexe.

Pour ce qui est de la modification des baculovirus, nous avons exploité le génie génétique pour améliorer leur efficacité contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette. Bien entendu, l'impact sur l'environnement et l'innocuité pour les organismes non visés passent avant tout dans le cadre de ce programme. L'une des méthodes que nous avons utilisées consistait à prendre un gène de la tordeuse des bourgeons de l'épinette, à l'épisser dans un virus spécifique à l'hôte, puis à l'exprimer à nouveau chez la tordeuse des bourgeons. De cette façon, aucun gène ou élément exogène n'est introduit dans le système. Laissez-moi vous donner un exemple. Nous savons que l'hormone ecdysone initie et régule la mue chez les larves. Lorsque l'ecdysone (ainsi que d'autres facteurs) se lie à l'ADN, elle enclenche l'expression d'un certain nombre de gènes intervenant dans la mue — l'un d'eux est un facteur de transcription appelé CHR3. Lorsque le niveau de CHR3 baisse pour atteindre une certaine valeur, nous observons l'expression de l'enzyme dopadécarboxylase (DDC), qui est nécessaire au tannage et au durcissement de la nouvelle cuticule des insectes. Si le CHR3 est toujours exprimé à un niveau élevé, l'expression de la DDC reste faible. Nous avons utilisé le génie génétique pour insérer le gène codant pour le CHR3 dans un baculovirus, et les larves, une fois infectées par ce virus, ont mué mais leur cuticule n'a pas durci convenablement. Les pièces buccales des larves sont restées molles,

empêchant l'alimentation. Nous avons donc réussi à inhiber l'alimentation des larves, et c'est tout ce qu'il faut pour réprimer la tordeuse des bourgeons de l'épinette. Nous avons réussi à inhiber l'alimentation en hyperexprimant un facteur de transcription qui appartient bel et bien à l'insecte, sans avoir à introduire un autre élément dans ce système ni à altérer la niche écologique.

Ces derniers temps, nous nous sommes intéressés à des virus infectant des ordres d'insectes plus anciens que les lépidoptères. Les virus infectant les diprions, qui appartiennent à l'ordre des hyménoptères nous intéressent tout particulièrement. Des fossiles témoignent que les hyménoptères datent d'environ 110 millions d'années de plus que les lépidoptères. Les virus des diprions (genre *Neodiprion*) sont les plus efficaces de tous les agents viraux de lutte et rivalisent avec les produits chimiques sur le plan des coûts et de l'efficacité. Avant 1950, le diprion européen de l'épinette (*Gilpinia hercyniae*) dévastait les forêts, de façon très semblable à ce que fait la tordeuse des bourgeons de l'épinette de nos jours. L'introduction d'un virus spécifique à cette population — homologué comme agent de lutte biologique au Canada par le Service canadien des forêts (SCF) — a non seulement entraîné l'effondrement des infestations, mais a également déclenché une épizootie[3] qui tient encore l'insecte en échec. Pour découvrir pourquoi les virus du diprion étaient aussi efficaces, nous avons décidé de séquencer le génome du virus de la polyédrose nucléaire ou nucléopolyhédrovirus du *Neodiprion lecontei* (NeleNPV), qui infecte le diprion de LeConte (*N. lecontei*). Nous avons constaté que son génome avait environ 81 000 paires de base, ce qui en fait le plus petit génome de baculovirus séquencé jusqu'à maintenant. Le génome du NeleNPV ressemble aux génomes des virus des lépidoptères sur le plan de son organisation, mais en diffère sensiblement à d'autres égards. Il contient beaucoup moins de gènes et d'ORF (cadres ouverts de lecture) que le génome du baculovirus des lépidoptères le plus étudié, le nucléopolyhédrovirus d'*Autographa californica* (AcMNPV). Le NeleNPV est également dépourvu des protéines jugées essentielles au fonctionnement du virus, mais n'en est pas moins un agent de lutte très efficace.

Les virus des diprions se répliquent uniquement dans l'intestin moyen des larves, tandis que ceux de lépidoptères se répliquent dans divers tissus, y compris le tissu adipeux et épidermique. À l'évidence, au fil de la coévolution des virus et de leurs hôtes naturels, les virus ont réussi à acquérir de nouveaux gènes qui leur permettent non seulement d'envahir d'autres tissus, mais également de survivre à la physiologie complexe des larves et à leurs changements hormonaux réguliers. Je vais résumer plus loin certains des mécanismes qui se sont développés.

Le génome du NeleNPV renferme tous les gènes essentiels dont les baculovirus ont besoin pour envahir l'intestin moyen, sauf un gène codant pour une protéine F (ou son homologue fonctionnel), qui est un ingrédient essentiel du phénotype bourgeonné. Comme je l'ai souligné précédemment, un entomovirus typique produit un phénotype bourgeonné pour infecter les tissus des larves. Nous en avons donc conclu que ce phénotype peut ne pas jouer un rôle dans la biologie des virus des diprions. Nous collaborons avec des collègues de la University of Florida et de l'Institut des sciences biomédicales de São Paulo (Brésil) à l'analyse des virus des diprions. Les résultats obtenus jusqu'à maintenant ont fourni des preuves à l'appui de notre théorie.

Ces données et d'autres données obtenues à partir de certains baculovirus laissent entrevoir une relation très complexe entre les insectes et leurs virus pathogènes — une coévolution. Lorsque j'étudiais la virologie en Grande-Bretagne il y a plusieurs années, les étudiants se faisaient dire de façon très explicite qu'un virus infecte une cellule, se multiplie, puis tue la cellule. Les chercheurs pensent maintenant que la cellule hôte, dès le début d'une infection virale, tente rapidement de s'autodétruire pour protéger l'organisme, alors que le virus s'efforce de garder la cellule en vie pour pouvoir se multiplier. La coévolution baculovirus–insecte pourrait donc s'être déroulée de la façon suivante. Pour faire face à l'apoptose (processus de mort programmée) des cellules hôtes, le virus a acquis des inhibiteurs des protéines de l'apoptose, dont certaines proviennent probablement de l'insecte. À mesure que le virus s'appropriait ces gènes, l'insecte développait à son tour un mécanisme de destruction cellulaire qui n'était manifestement pas à l'avantage du virus. Le virus a dû alors se doter d'autres mécanismes et facteurs pour envahir des tissus autres que ceux de l'intestin moyen des larves. Ces facteurs comprennent notamment les gènes IE-0, ORF Ac23 et une protéine de fusion de la membrane. Je pense que c'est à ce moment-là que le génome viral a évolué pour synthétiser un phénotype bourgeonnant. Une fois franchie la barrière de l'intestin moyen, le virus a dû faire face à la mue larvaire, un processus qui semble néfaste à sa réplication. Il a ensuite dû acquérir un gène codant pour une enzyme, la glucosyltransférase stéroïde, qui conjugue l'ecdysone aux sucres pour l'inactiver. La mue se trouve ainsi arrêtée, et le virus peut se répliquer. Il est essentiel de se rappeler que tous ces changements évolutifs ont suivi la tendance générale des virus à devenir plus atténués et moins efficaces contre leur hôte naturel.

Lorsque nous alignons deux génomes de virus des diprions, qui appartiennent à un ordre ancien d'insectes, nous observons, malgré la disposition colinéaire de la plupart des gènes, une région non synténique[4] où les gènes présumés ressemblent davantage à ceux de l'hôte qu'à d'autres gènes de baculovirus. Nous croyons que cette région renfermaient les gènes de l'hôte qui ont disparu au fil de l'évolution des virus vers les baculovirus modernes. Ces études nous donneront certainement un bon aperçu du fonctionnement du génome de baculovirus. Conjuguées à la génomique des insectes, elles nous permettront également d'élaborer des stratégies intelligentes de lutte contre les ravageurs forestiers et les ennemis des cultures.

Nos travaux nous ont permis de transférer notre technologie à d'autres secteurs. Nous possédons un brevet international sur tous les facteurs de transcription exprimés chez les baculovirus.

3. Une épidémie qui frappe une population animale.

4. Localisation sur des chromosomes différents chez les deux espèces.

Nous collaborons actuellement avec des chercheurs de la Grande-Bretagne, des États-Unis et de la Chine, où nous avons transféré le gène de la fusoline d'un entomopoxvirus à l'Institut de virologie de Wuhan, de l'Académie chinoise des sciences. En collaboration avec l'IGO, nous avons entrepris un projet visant à produire un virus génétiquement modifié contre l'*Anticarsia gemmatalis*, un lépidoptère ravageur des plantations de soja en Amérique du Sud et ailleurs. Ce projet intéressera l'industrie multimilliardaire du soja.

Quels sont les résultats escomptés de la génomique structurale et fonctionnelle des insectes et de leurs virus pathogènes? À mesure que le projet évolue, de concert avec des projets semblables dans d'autres régions du monde, nous prévoyons

- identifier des domaines cibles clés pour lutter contre les insectes (par exemple, le système immunitaire);
- trouver des molécules bioactives (antimicrobiens, enzymes, protéines antigel);
- enrichir nos connaissances sur l'expression des protéines, transformer des cellules germinales et produire des protéines bioactives;
- approfondir les interactions plante–insecte afin de mettre au point des antiappétants;
- améliorer les pathogènes utilisés en lutte biologique;
- construire un modèle des interactions insecte–parasite;
- mieux comprendre l'évolution des baculovirus; et
- faire progresser le domaine de la génomique fonctionnelle comparative.

Comme le montre cette liste, c'est notre intérêt pour la biologie qui nous pousse à étudier la génomique et non pas le contraire.

J'aimerais remercier les autres personnes participant à ce programme particulier de l'IGO : Qili Feng et Arthur Retnakaran, SCF, CFGL; Chris Lucarotti, SCF, Centre de foresterie de l'Atlantique; Peter Krell, University of Guelph; David Theilmann, Agriculture et Agroalimentaire Canada, Centre de recherches agroalimentaires du Pacifique; Michel Cusson, SCF, Centre de foresterie des Laurentides; David Evans, University of Alberta; et Eric Carstens, Queen's University. Nous comptons des collaborateurs dans plusieurs pays : Richard Moyer, de la University of Florida, aux États-Unis; Elisabeth Herniou, de l'Imperial College London en Angleterre; Paolo Zanotto, de l'Université de São Paulo, ainsi que Flávio Moscardi, de la Société brésilienne de recherche agricole, au Brésil; et Hu Zhihong, de l'Institut de virologie de Wuhan, Académie chinoise des sciences, et l'Université agricole du Sud-Ouest, en Chine.

Recherche de sites cibles pour la lutte contre les insectes

Michel Cusson | Centre de foresterie des Laurentides, Service canadien des forêts, Ressources naturelles Canada, Québec (Québec)

Peter Krell et Basil Arif ont donné un bon aperçu de la recherche dont je vais parler aujourd'hui. Ce projet de recherche relève principalement du programme 4 de l'Initiative de R-D en génomique du Service canadien des forêts (SCF)[1], en particulier du programme appelé « Outils utilisant l'hormone juvénile pour lutter contre les insectes forestiers nuisibles ». Certains travaux que mes collègues et moi-même avons effectués sont rattachés au programme 1 de cette initiative,[2] plus précisément au projet concernant la « génomique structurale, fonctionnelle et comparative des insectes nuisibles ».

Deux laboratoires du SCF participent à ces travaux : mon laboratoire du Centre de foresterie des Laurentides de Québec et celui de Qili Feng du Centre de foresterie des Grands Lacs (CFGL) de Sault Ste. Marie (Ontario). Pour mieux décrire ce projet, disons qu'il s'agit d'une recherche de sites moléculaires cibles dans le contexte de la lutte contre les insectes ravageurs.

Qu'est-ce qu'un site moléculaire cible et pourquoi en chercher? Dans le contexte de la lutte contre les insectes ravageurs, les sites cibles sont des protéines — des enzymes, des récepteurs ou des protéines porteuses spécifiques à un insecte ou à un groupe d'insectes — intervenant habituellement dans un processus spécifique aux insectes, comme la mue, la métamorphose ou la reproduction. Puisque l'action de ces protéines est spécifique, il peut être possible d'utiliser des inhibiteurs ou des antagonistes pour la perturber, avec un minimum d'effets sur les organismes non ciblés. Par ailleurs, les gènes codant pour ces protéines peuvent, le cas échéant, servir à mettre au point des insecticides microbiens plus efficaces, comme en témoignent les travaux de Basil Arif sur la tordeuse des bourgeons de l'épinette. L'identification et la caractérisation de tels sites cibles peuvent accélérer la mise au point de produits antiparasitaires nouveaux contre des ravageurs forestiers précis.

Dans le contexte de la recherche de sites cibles, nous nous intéressons aux protéines suivantes : les enzymes, les récepteurs hormonaux et les protéines porteuses, qui ont tous un ligand (une molécule qui se fixe à un site spécifique d'une protéine). Le ligand et la protéine associée se « reconnaissent » l'un et l'autre, à la manière d'une clé dans une serrure. Dans le cas des enzymes, le ligand est un substrat qui se lie à la cavité catalytique de l'enzyme, y déclenchant un processus catalytique qui transforme le substrat en de nouveaux produits. Les hormones, tout comme les ligands, ont également des récepteurs de protéines auxquels elles se lient de manière spécifique. Cette liaison provoque des changements de la conformation du récepteur, ce qui, à son tour permet au complexe récepteur–hormone de se lier à une région spécifique d'ADN souvent appelée élément de réponse. Cette dernière liaison déclenche la transcription de l'ADN et une cascade d'événements au niveau moléculaire, importants sur le plan biologique.

Pour perturber l'interaction protéine-ligand, on peut repérer ou élaborer un inhibiteur compétitif ou un antagoniste qui ressemble suffisamment au ligand naturel pour se fixer étroitement au site actif de la protéine, sans déclencher la réaction biochimique habituellement provoquée par le ligand naturel. Cette méthode est souvent utilisée en recherche pharmaceutique.

Quelles sont les étapes de cette stratégie de recherche de nouveaux sites cibles visant à mettre au point des produits antiparasitaires? Le chercheur doit tout d'abord identifier un nouveau site cible à l'aide de l'une des nombreuses méthodes exploratoires — par exemple, en construisant des collections de séquences EST (étiquettes de séquences exprimées) ou en choisissant un site cible candidat connu ou présumé sur la base des connaissances disponibles sur la biologie de l'insecte. Il doit ensuite cloner l'ADN complémentaire (ADNc) approprié, c'est-à-dire le gène. Une fois le gène disponible, le chercheur peut envisager diverses possibilités. Il peut juger indiqué d'utiliser le gène pour mettre au point un agent microbien pour renforcer l'action insecticide; dans un tel cas, il devra soumettre les agents microbiens modifiés à des essais afin de déterminer si la manipulation génétique confère une amélioration mesurable de cette action. Une autre possibilité — et c'est le but visé par ce projet de recherche — est de produire une protéine recombinante et d'élaborer un essai *in vitro* pour le criblage à haut débit des inhibiteurs ou des antagonistes potentiels. Avec ce type d'approche, il sera souvent utile de déterminer ou de modéliser la structure tridimensionnelle de la protéine afin de pouvoir examiner la taille et la forme du site de liaison et d'évaluer l'efficacité vraisemblable d'une stratégie d'inhibition ou d'antagonisme. Une fois la structure connue, nous pouvons utiliser une technologie assistée par ordinateur pour effectuer un premier criblage des molécules inhibitrices ou antagonistes potentielles, puis soumettre les plus prometteuses à un essai *in vitro*. Les molécules qui montrent le meilleur potentiel antiparasitaire lors de ces essais peuvent ensuite être soumises à des essais *in vivo*.

Les deux principaux projets de recherche de sites cibles financés par l'Initiative de R-D en génomique du SCF visent à bloquer la biosynthèse ou l'action d'une hormone sécrétée par les insectes et appelée hormone juvénile (JH). Certains de nos travaux portent toutefois sur d'autres types de sites cibles qui n'ont aucun rapport avec l'hormone juvénile.

L'hormone juvénile joue un rôle dans le développement des insectes, notamment des lépidoptères, l'ordre auquel appartient notre principal insecte ravageur ciblé, la tordeuse des bourgeons de l'épinette (*Choristoneura fumiferana*). Peu après sa sortie de l'œuf, la larve commence à croître et subit un certain nombre de mues larvaires lors desquelles elle se débarrasse de son vieil exosquelette pour en acquérir un nouveau qui est plus

1. Le programme 4 de l'Initiative de R-D en génomique du SCF concerne l'élaboration de méthodes de protection des forêts qui soient acceptables sur le plan environnemental.
2. Le programme 1 de l'Initiative de R-D en génomique du SCF concerne la production des arbres forestiers et les systèmes de protection.

grand et lui permet de poursuivre son développement. Après ces mues, la larve recommence à croître tout en conservant des caractères juvéniles grâce à des taux élevés d'hormone juvénile. Une fois le dernier stade larvaire atteint, les taux d'hormone juvénile deviennent indécelables. C'est alors que l'ecdysone, l'hormone de mue, déclenche la métamorphose et la mue larvaire qui finira par donner le papillon.

On sait depuis longtemps que si on arrive à réduire artificiellement le taux d'hormone juvénile pendant les premiers stades de la vie larvaire, on provoquera une métamorphose précoce, un arrêt prématuré de l'alimentation et une interruption possible du développement avant le stade adulte, les chrysalides n'étant généralement pas viables. Nos laboratoires examinent deux des stratégies permettant d'induire une métamorphose précoce chez les larves de la tordeuse : (1) bloquer la production de l'hormone juvénile à l'aide d'un inhibiteur d'une enzyme de la biosynthèse de cette hormone et (2) bloquer l'action de l'hormone juvénile en empêchant sa liaison avec son récepteur. Ces deux stratégies aboutiraient au même résultat.

Il existe six formes connues d'hormone juvénile sesquiterpénoïde (figure 1), la plus commune et la plus simple étant la JH III qui est la seule hormone juvénile produite par la plupart des insectes. Toutefois, les lépidoptères produisent quatre autres formes de cette hormone, qui se reconnaissent à la présence d'une à trois chaînes éthyliques latérales sur le squelette de farnésyl de l'hormone. Nous sommes partis de l'hypothèse qu'une enzyme ou plus intervenant dans la biosynthèse des formes d'hormone juvénile des lépidoptères présentent des modifications de leur cavité catalytique leur permettant d'accommoder ces composés plus volumineux.

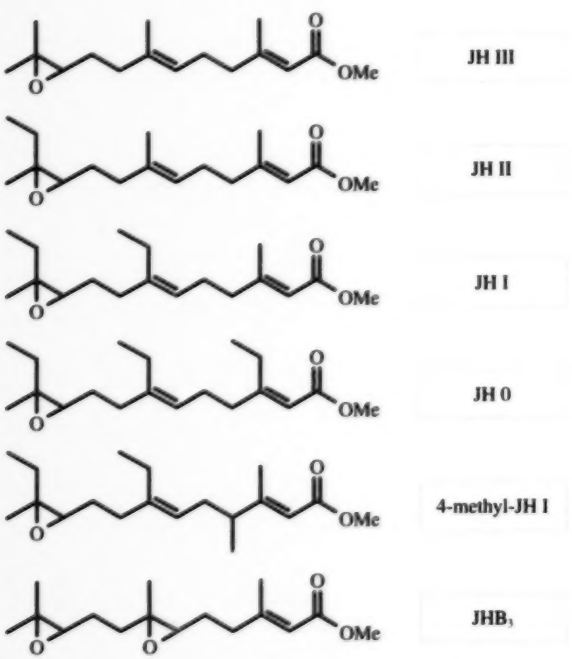


Figure 1. Les six formes connues de l'hormone juvénile. JH II, JH I, JH 0 et la 4-méthyl JH I n'ont été jusqu'ici trouvées que chez les lépidoptères. (O = oxygène; Me = méthyle)

Nous avons récemment fait la preuve que les lépidoptères produisent deux formes homologues très différentes de la farnésyl diphosphate synthase (FPPS). Cette enzyme intervient dans la formation du squelette carboné de la farnésyl de l'hormone juvénile et dans d'autres voies métaboliques. Nous avons cloné l'ADNc de la FPPS de lépidoptères représentatifs, y compris la tordeuse des bourgeons de l'épinette, ainsi que d'un certain nombre d'insectes autres que ceux de l'ordre des lépidoptères. Grâce à des comparaisons détaillées de séquences d'acides aminés, nous avons montré que l'une des deux FPPS de lépidoptères (type I) présente plusieurs substitutions uniques d'acides aminés dans sa cavité catalytique. Ainsi, nous avons découvert quatre substitutions dans le motif spécifique de cette protéine, qui est bien conservé chez tous les organismes vivants, sauf les lépidoptères. Nous avons utilisé la modélisation par homologie et des simulations de docking (amarrage/assemblage) pour examiner l'impact potentiel de ces substitutions sur le volume de la cavité catalytique et nous avons découvert que cette enzyme présentait effectivement une augmentation du volume de sa cavité par rapport aux FPPS « conventionnelles ». Par comparaison, le deuxième type de FPPS de lépidoptères présentait moins de substitutions dans son site actif et semblait, à cet égard, plus « conventionnel » que la protéine de type I, mais était toutefois unique à d'autres points de vue. Nous ne savons pas encore lequel de ces deux types de FPPS intervient dans la biosynthèse de l'hormone juvénile, mais nous savons que l'expression de l'enzyme de type II est essentiellement confinée aux glandes sécrétrices de l'hormone juvénile, alors que celle de l'enzyme de type I est plus généralisée (Cusson *et al.*, 2006). Que l'un ou l'autre de ces homologues de la FPPS intervienne dans la biosynthèse de l'hormone juvénile, il reste que les substitutions qui ont été identifiées chez l'un et l'autre pourraient faciliter la production du précurseur éthylé substitué de l'hormone juvénile. Par conséquent, il pourrait être possible de trouver un inhibiteur spécifique à cette cavité catalytique particulière, sans effet sur les FPPS conventionnelles, ce qui en ferait un composé spécifique aux lépidoptères. Nous mettons actuellement au point des essais *in vitro* pour vérifier ces hypothèses.

Au cours des dernières années, le groupe de Qili Feng s'est employé à isoler un récepteur de l'hormone juvénile. Cette dernière est une molécule discrète, et plusieurs laboratoires concurrents ont entrepris la difficile tâche de la cloner. À cette fin, Qili Feng et son équipe font appel à une stratégie originale fondée sur l'observation que l'hormone juvénile peut activer sa propre hydrolyse pour produire une forme inactive, la JH acide. Cette hydrolyse est due à l'action d'une enzyme spécifique appelée estérase de l'hormone juvénile (JHE), qui joue un rôle déterminant dans la préparation de l'insecte à la métamorphose. L'hormone juvénile peut activer très rapidement la transcription du gène de la JHE; les chercheurs pensent qu'elle y arrive en se liant à son récepteur, le complexe hormone-récepteur se liant par la suite à un élément de réponse dans le promoteur[3] du gène de la JHE qui, à son tour, active la transcription de la JHE. Le groupe de Qili Feng a identifié

3. Site de l'ADN sur lequel l'ARN polymérase se fixe pour amorcer la transcription.

l'élément de réponse à 30 paires de bases dans ce promoteur (Kethidi *et al.*, 2004). Il a utilisé la luciférase, un gène rapporteur (ou marqueur génétique), pour obtenir des constructions de ce promoteur et a transformé une culture de cellules de la tordeuse des bourgeons de l'épinette. Le traitement de ces cellules avec l'hormone juvénile induit le gène rapporteur de façon mesurable, fournissant ainsi un système d'essai cellulaire. Ce système pourrait servir à cribler des antagonistes de l'hormone juvénile, qui pourraient vraisemblablement bloquer la liaison au récepteur de l'hormone juvénile et, par conséquent, l'activité de l'hormone juvénile. En utilisant l'ADN de l'élément de réponse comme sonde, les chercheurs ont pu identifier une nucléoprotéine qui s'y lie spécifiquement et qui est donc un récepteur candidat de l'hormone juvénile. Ils s'emploient actuellement à purifier cette protéine.

J'aimerais maintenant attirer votre attention sur la chitinase, une enzyme qui intervient dans la dégradation de la chitine, un homopolymère de *N*-acétylglucosamine et un constituant principal de la cuticule des insectes, sécrété par l'épiderme. L'expression de la chitinase est déclenchée juste avant la mue par l'ecdysone ou hormone de mue. Elle contribue à la dégradation de la vieille cuticule lors de la mue. Dans ce cas précis, le groupe de Qili Feng a utilisé l'ADNc de la chitinase pour modifier le nuclépolyhédrovirus de l'*Autographa californica* ou AcMNPV (Zheng *et al.*, 2002) de manière à pouvoir l'utiliser comme insecticide viral contre un certain nombre d'insectes ravageurs. Il a effectué des essais avec ce virus modifié et l'a comparé au virus parental. D'après les résultats obtenus, le gène de la chitinase est un excellent candidat pour l'amélioration génétique des baculovirus.

Quelle est l'importance de cette recherche pour le Canada? En premier lieu, elle contribue à maintenir le Canada à la fine pointe de la recherche sur la lutte antiparasitaire fondée sur la génomique et du développement de produits antiparasitaires. En deuxième lieu, elle vise à découvrir des produits antiparasitaires efficaces et sans danger pour l'environnement pour élargir la gamme d'outils de lutte contre les ravageurs forestiers. En effet, les outils de lutte contre les insectes ravageurs, comme la tordeuse des bourgeons de l'épinette, sont actuellement très peu nombreux. De plus, certaines des protéines des sites cibles clonées au CFGL servent à mettre au point des insecticides viraux plus efficaces contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette et d'autres ravageurs. Comme l'ont souligné d'autres conférenciers lors de ce symposium, certaines percées permises par cette recherche peuvent avoir des retombées dans d'autres domaines — par exemple, permettre la mise au point de commutateurs géniques à l'aide d'un récepteur de l'ecdysone [voir Krell, dans la présente publication]. Il semble très possible que les chercheurs puissent également utiliser des récepteurs de l'hormone juvénile pour effectuer des commutations géniques similaires, compte tenu de l'absence d'hormone juvénile chez l'homme. En dernier lieu, les deux laboratoires participant à cette recherche ont énormément contribué à la formation de personnel hautement qualifié dans le domaine de la biotechnologie des insectes au cours des cinq dernières années, y compris huit détenteurs d'une bourse de perfectionnement postdoctoral et de nombreux étudiants et techniciens.

Nous collaborons notamment avec des chercheurs de l'Indiana University–Purdue University d'Indianapolis; de la University of Kentucky, de la Faculté universitaire des sciences agronomiques de Gembloux de Belgique, du Highthroughput Factory du RIKEN Harima Institute du Japon, dont un collaborateur participe aux travaux de modélisation par homologie, de l'Université agricole du Sud-Ouest de la Chine ainsi qu'avec Peter Krell, de la University of Guelph, en Ontario.

Notre recherche a principalement été financée par l'Initiative de R-D en génomique du SCF et par Génome Canada, par l'entremise de l'Institut de génomique de l'Ontario. Nous avons également reçu des fonds du Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG), du Réseau Biocontrôle, du SCF et du ministère des Relations internationales du Québec.

Pour ce qui est de l'orientation future de notre recherche, il est maintenant possible d'explorer un certain nombre de possibilités, mais, selon moi, nous devrions faire converger nos efforts sur les sites cibles les plus prometteurs, tout en explorant les nouvelles pistes fournies par les travaux en cours sur les microréseaux. En effet, les collections de séquences EST de la tordeuse et les séquences de génomes de virus construites récemment nous fourniront de nouveaux outils pour mettre au point des puces à ADN ou des microréseaux qui nous aideront à identifier les gènes qui pourraient être ciblés par des pathogènes viraux. Nous devons également renforcer l'expertise du SCF en bioinformatique structurale et en biochimie des protéines afin d'accélérer l'étape de mise au point de produits. Enfin, il faudra chercher des partenaires industriels lorsque les essais *in vitro* et cellulaires seront suffisamment perfectionnés pour permettre de cribler des composés.

Bibliographie

Cusson, M.; Béliveau, C.; Sen, S.E.; Vandermoten, S.; Rutledge, R.J.; Stewart, D.; Francis, F.; Haubruge, É.; Rehse, P.; Huggins, D.J.; Dowling, A.P.G.; Grant, G.H. 2006. Characterization and tissue-specific expression of two lepidopteran farnesyl diphosphate synthase homologs: implications for the biosynthesis of ethyl-substituted juvenile hormones. Proteins Struct. Funct. Bioinformat. (Sous presse)

Kethidi, D.R.; Perera, S.C.; Zheng, S; Feng, Q; Krell, P.; Retnakaran, A; Palli, S.R. 2004. Identification and characterization of a juvenile hormone (JH) response region in the JH esterase gene from the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. J. Biol. Chem. 279: 19634–19642.

Zheng, Y.; Zheng, S.; Cheng, X.; Ladd, T.; Lingohr, E.J.; Krell, P.J.; Arif, B.M.; Retnakaran, A.; Feng, Q. 2002. A molt-associated chitinase cDNA from the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. Insect Biochem. Mol. Biol. 32:1813–1823.

Génomique fonctionnelle du nucléopolyhédrovirus du diprion

Christopher J. Lucarotti | Centre de foresterie de l'Atlantique, Service canadien des forêts, Ressources naturelles Canada, Fredericton (N.-B.)

Le diprion du sapin (*Neodiprion abietis*), un insecte indigène de Terre-Neuve, a été un ravageur forestier d'importance mineure jusqu'en 1990. Depuis, il a toutefois causé une défoliation modérée à grave sur quelque 260 000 hectares dans les peuplements de sapin baumier (*Abies balsamea*) de grande valeur de la province (Moreau, 2006). L'augmentation récente des dégâts causés par le diprion semble être liée à une pratique sylvicole, l'éclaircie précommerciale (Moreau *et al.*, 2006).

Les diprions sont des hyménoptères primitifs d'un sous-ordre d'insectes (les symphytes) vieux d'environ 250 millions d'années, tandis que les lépidoptères datent d'environ 150 millions d'années. Les nucléopolyhédrovirus du diprion, aussi appelé virus de la polyédrose nucléaire ou VPN, sont probablement les ancêtres des baculovirus présents chez les lépidoptères et datent d'avant la séparation des VPN et des granulovirus[1] chez les lépidoptères (Garcia-Maruniak *et al.*, 2004; Lauzon *et al.*, 2004). Par conséquent, les VPN du diprion ont des génomes plus petits et des cycles biologiques plus simples que les VPN des lépidoptères.

Les VPN du diprion et des lépidoptères se distinguent par la façon dont ils infectent leurs hôtes. Les premiers infectent uniquement les cellules de l'intestin moyen des larves, alors que les seconds commencent par infecter l'intestin moyen, puis se propagent aux tissus internes comme les tissus adipeux. Les VPN du diprion infectent rapidement une population parce que les diprions sont souvent grégaires et se nourrissent à découvert sur le feuillage et que l'infection virale se limite à leur intestin moyen, de façon très semblable à une grippe intestinale. Plus de 80 % de la mortalité larvaire observée chez les populations du diprion du sapin peut être attribuée au VPN spécifique à cette espèce (NeabNPV) (Moreau, 2004). La vitesse de propagation des VPN des lépidoptères dépend toutefois d'un certain nombre de facteurs; chez les larves qui sont grégaires et ont tendance à s'alimenter à découvert sur le feuillage, l'infection se propage plus facilement. En revanche, la tordeuse des bourgeons de l'épinette (*Choristoneura fumiferana*) a tendance à mieux résister à l'infection par ses baculovirus, car elle a moins d'occasions d'être exposée et, en cas d'exposition, ses larves sont plus âgées, plus grosses et moins vulnérables. Les premiers stades larvaires de la tordeuse des bourgeons minent les nouvelles aiguilles et les bourgeons du sapin baumier et de l'épinette blanche (*Picea glauca*), et les larves n'en sortent pour s'alimenter à découvert que lors des derniers stades ou lorsque la densité de la population est élevée. Par conséquent, le pourcentage de mortalité de la tordeuse des bourgeons de l'épinette attribuable à des VPN est inférieur à 2 % (Lucarotti *et al.*, 2004).

Les applications de VPN peuvent être des outils de lutte antiparasitaire efficaces; une seule application de l'ordre de 1 à 10 milliards de corps d'inclusion/hectare suffit généralement contre les diprions, alors que des doses de cent à mille fois plus élevées sont nécessaires pour arriver à lutter contre les lépidoptères ravageurs (Cunningham et Kaupp, 1995).[2]

Ayant constaté que le NeabNPV était la principale cause de mortalité chez les populations du diprion du sapin (Moreau, 2004), l'équipe de chercheurs qui étudie le diprion du sapin et le NeabNPV au Centre de foresterie de l'Atlantique du Service canadien des forêts (SCF) a décidé de s'employer à faire homologuer le nucléopolyhédrovirus comme agent de lutte biologique. Elle a inclus dans la demande d'homologation les données des essais sur l'efficacité des pulvérisations aériennes effectués pendant trois ans. La superficie maximale pour laquelle l'Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire (ARLA) de Santé Canada accorde un permis de recherche forestière est de 5 000 hectares. Nous avons pulvérisé le NeabNPV à raison de 1 à 3 milliards de corps d'inclusion/hectare dans 2,5 L d'une solution aqueuse de mélasse à 20 % à l'aide d'un Cessna 188 équipé de quatre atomiseurs Micronaire AU4000 installés sous les ailes. Après l'application, nous avons observé une augmentation de la prévalence du NeabNPV chez les populations du diprion du sapin et, au cours de l'année suivante, un déclin rapide des populations qui avaient été jusque-là en hausse ou maximales (Moreau *et al.*, 2005). En juin 2004, nous avons déposé auprès de l'ARLA une demande d'homologation du NeabNPV, sous l'appellation commerciale Abietiv^{MC}, pour usage contre le diprion du sapin.

Le projet sur le diprion du sapin–NeabNPV a pu compter sur les ressources humaines et les installations du SCF et le soutien de l'Initiative de R-D en génomique du SCF et ainsi que sur le Programme des méthodes améliorées de lutte antiparasitaire. Nous avons entrepris le projet grâce à une subvention du Programme de partenariat de recherche industrie-SCF-Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG), qui a été suivie d'un soutien du CRSNG par le biais du Réseau Biocontrôle. De plus, puisque nous avons pu appliquer le NeabNPV sur 5 000 hectares de forêt par année lors de nos essais d'efficacité, nous avons reçu des fonds additionnels de la province de Terre-Neuve-et-Labrador et de nos partenaires industriels, la Corner Brook Pulp and Paper Ltd. (une filiale de la Kruger Inc.) et de l'Abitibi-Consolidated Inc. Nous avons ainsi pu effectuer des applications expérimentales à un moindre coût, soit environ 80 $/hectare de forêt traité.

1. Deux genres forment la famille des *Baculoviridae*, soit les nucléopolyhédrovirus et les granulovirus.

2. Les corps d'inclusion (ou d'occlusion) sont des structures protéiques renfermant les virus. Ils se forment dans les cellules hôtes et sont libérés dans l'environnement à la mort de celles-ci, assurant ainsi la survie du virus à l'extérieur des cellules et l'infection ultérieure d'autres cellules hôtes.

La collecte des données nécessaires à l'homologation du NeabNPV comme outil de lutte biologique a facilité d'autres travaux de recherche connexes sur le diprion du sapin. Nous avons étudié la dynamique, l'écologie et l'impact sur la forêt des populations du diprion afin de combler les lacunes dans nos connaissances sur cet insecte. Nous avons étudié l'épidémiologie, la pathologie et la prévalence du NeabNPV chez les populations naturelles de son hôte. Enfin, nous nous sommes aventurés dans le domaine de la génomique fonctionnelle. Nous avons publié un article sur la séquence du génome du VPN du diprion de LeConte (*Neodiprion lecontei*) (Lauzon *et al.*, 2004), au même moment où un autre groupe basé à la University of Florida, à Gainesville, publiait un article sur la séquence du génome du VPN du diprion du pin sylvestre (*N. sertifer*) (Garcia-Maruniak *et al.*, 2004). Les résultats de cette recherche sur le génome, ainsi que les données sur la séquence du génome du NeabNPV alors disponibles (S. Duffy *et al.*, University of Victoria, Colombie-Britannique, comm. pers.), ont été joints à la demande d'homologation que nous avons présentée à l'ARLA.

Quelle est l'utilité de la génomique fonctionnelle pour notre projet de recherche? Les baculovirus peuvent être considérés comme des fossiles vivants en ce sens qu'ils témoignent de l'évolution d'un groupe de virus à ADN. Grâce à la génomique fonctionnelle et à des comparaisons des génomes, les chercheurs peuvent beaucoup apprendre sur l'évolution des baculovirus et probablement sur celle d'autres virus à ADN. La génomique fonctionnelle peut aussi faciliter l'homologation de baculovirus comme agents de lutte biologique, permettant aux chercheurs de déterminer les points communs entre les séquences des génomes de différents baculovirus et la présence éventuelle d'une quelconque anomalie dans un génome donné. C'est notre souhait que de tels renseignements puissent accélérer le processus d'homologation d'un baculovirus. Un chercheur pourrait également mettre au point des méthodes antiparasitaires sans danger pour l'environnement en modifiant génétiquement des baculovirus; ainsi, il pourrait rendre un VPN de lépidoptère plus efficace en le modifiant pour qu'il se comporte comme un VPN de diprion.

Je remercie de leur contribution à ce projet de recherche le ministère des Ressources naturelles de Terre-Neuve-et-Labrador, l'Abitibi-Consolidated Inc. et la Corner Brook Pulp and Paper Ltd., le Réseau Biocontrôle, le SCF, la Forêt modèle de Fundy, la Société de protection des forêts contre les insectes et les maladies (SOPFIM) du Québec et le ministère des Richesses naturelles de l'Ontario. Je veux aussi exprimer toute ma gratitude à Basil Arif (SCF, Centre de foresterie des Grands Lacs) pour ses travaux de séquençage du génome du VPN du diprion de LeConte ainsi qu'à David Levin (University of Victoria) pour ses travaux de séquençage du VPN du diprion du sapin. Enfin, je veux remercier Eldon Eveleigh, Steve Holmes, Ed Kettela, Gaétan Moreau, Benoit Morin, Don Ostaff, Harald Piene, Graham Thurston, Charles Weaver, Grant White (SCF, Centre de foresterie de l'Atlantique), Dan Quiring (Université du Nouveau-Brunswick) et les nombreux étudiants des cycles supérieurs et adjoints de laboratoire et/ou de terrain qui ont collaboré aux essais d'efficacité sur le terrain d'Abietiv[MC] et aux études sur les impacts et sur l'écologie du diprion du sapin.

Bibliographie

Cunningham, J. C.; Kaupp, W. J. 1995. Les virus entomopathogènes. Pages 327–340 *in* Insectes forestiers ravageurs au Canada, publié sous la direction de J. A. Armstrong et W. G. H. Ives. Ressources naturelles Canada, Service canadien des forêts, Ottawa (Ontario).

Garcia-Maruniak, A.; Maruniak, J.E.; Zanotto, P.M.A.; Doumbouya, A.E.; Liu, J.C.; Merritt, T.M.; Lanoie, J.S. 2004. Sequence analysis of the genome of the *Neodiprion sertifer* nucleopolyhedrovirus. J. Virol. 78:7036–7051.

Lauzon, H.A.M.; Lucarotti, C.J.; Krell, P.J.; Feng, Q.; Retnakaran, A.; Arif, B.M. 2004. Sequence and organization of the *Neodiprion lecontei* nucleopolyhedrovirus genome. J. Virol. 78:7023– 7035.

Lucarotti, C.J.; Eveleigh, E.S.; Royama, T.; Morin, B.; McCarthy, P.; Ebling, P.M.; Kaupp, W.J.; Guertin, C.; Arella, M. 2004. Prevalence of baculoviruses in spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae) populations in New Brunswick. Can. Entomol. 136:255–264.

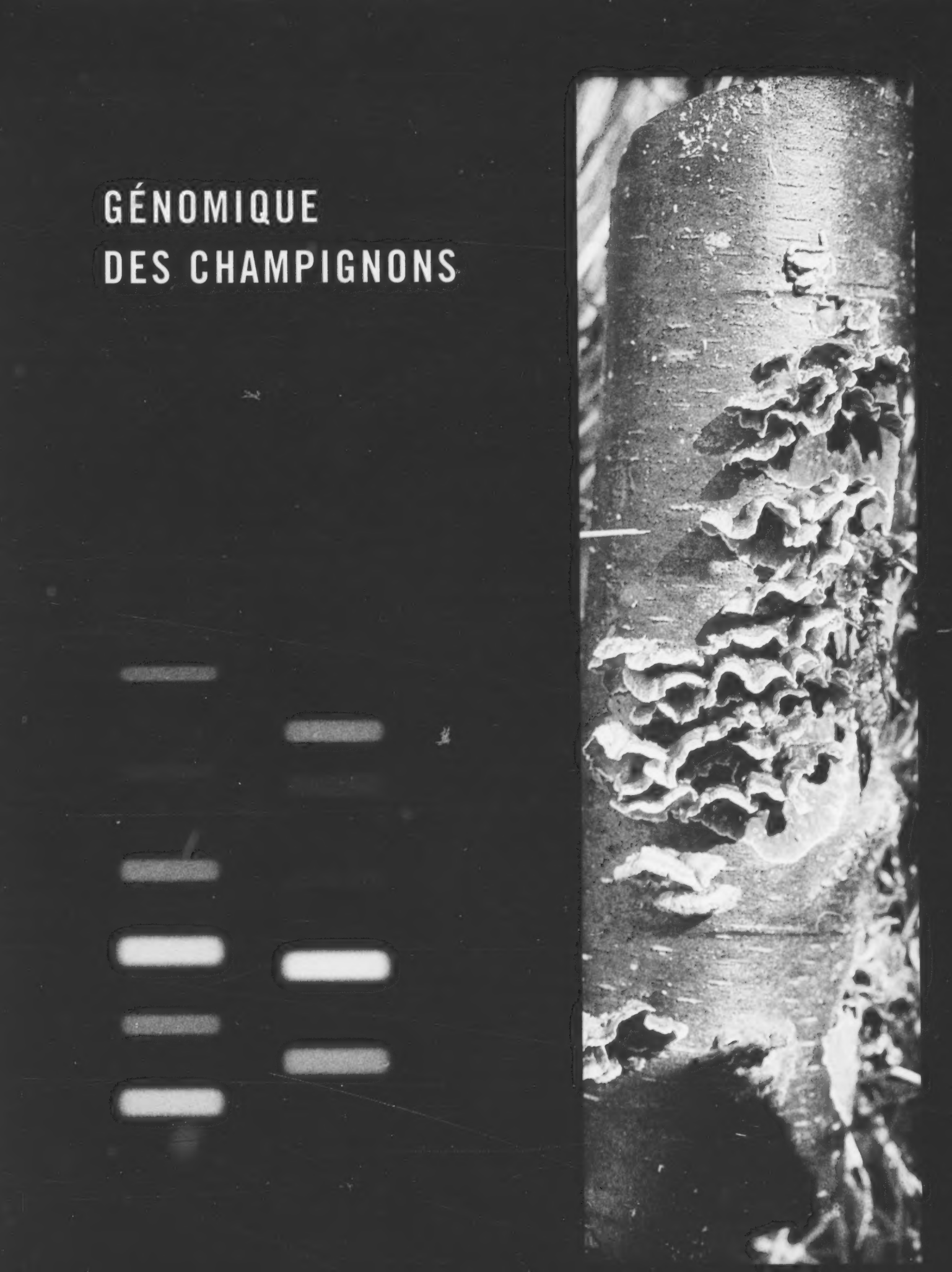
Moreau, G. 2004. The influence of forest management on defoliator populations: a case study with *Neodiprion abietis* in precommercially thinned and natural forest stands. PhD dissertation, University of New Brunswick, Fredericton, NB.

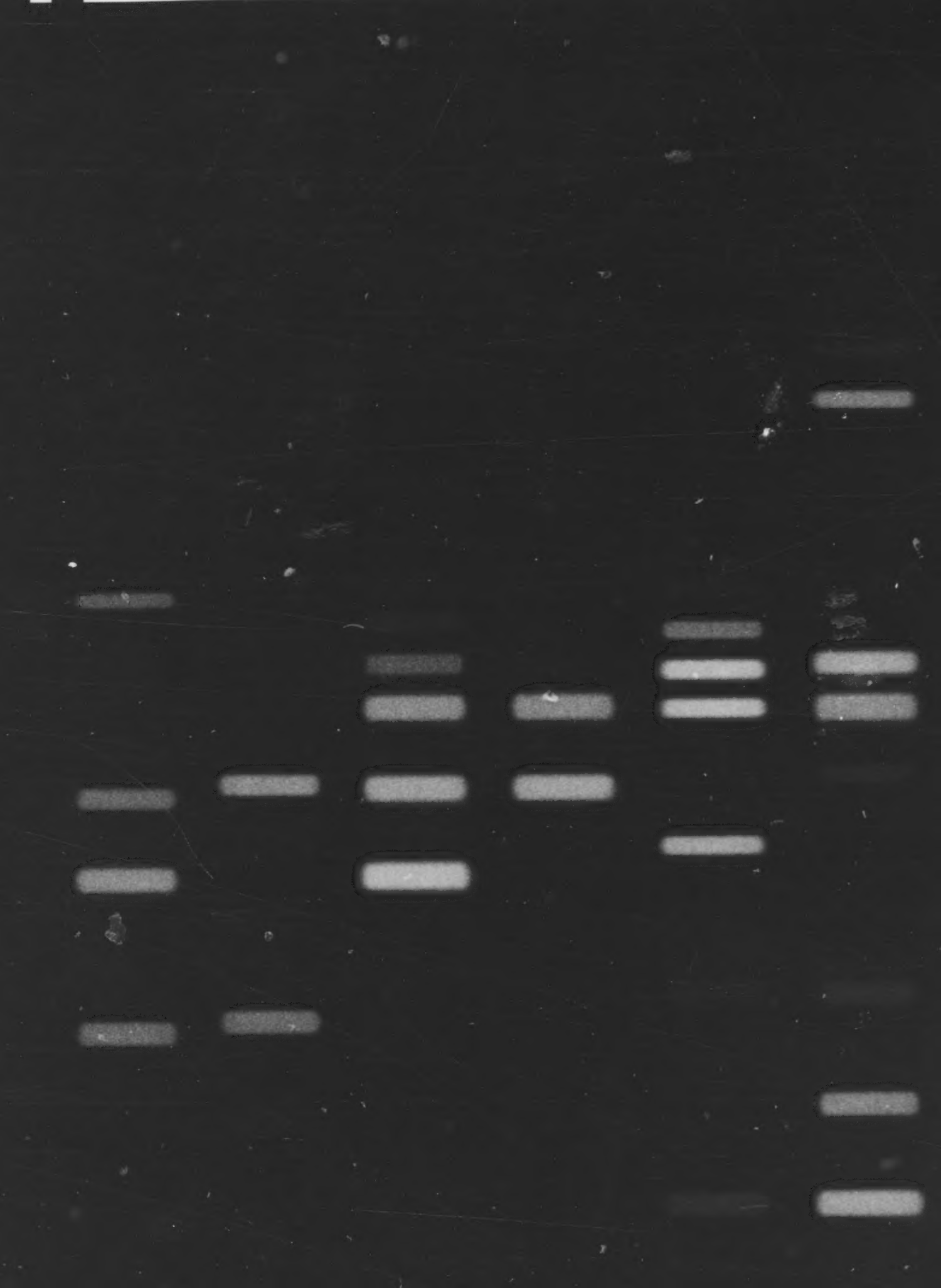
Moreau G. 2006. Past and present outbreaks of the balsam fir sawfly in western Newfoundland: an analytical review. For. Ecol. Manag. 221:215–219.

Moreau, G.; Eveleigh, E.S.; Lucarotti, C.J.; Quiring, D.T. 2006. Stage-specific responses to ecosystem alteration in an eruptive herbivorous insect. J. Appl. Ecol. 43: doi:10.1111/j. 1365–2664. 2005.01114.x.

Moreau, G.; Lucarotti, C.J.; Kettela, E.G.; Thurston, G.S.; Holmes, S.; Weaver, C.; Levin, D.B.; Morin, B. 2005. Aerial application of nucleopolyhedrovirus induces decline in increasing and peaking populations of *Neodiprion abietis*. Biol. Control 33:65–73.

GÉNOMIQUE DES CHAMPIGNONS





Approches génomiques servant à l'identification d'enzymes fongiques utiles à l'industrie forestière

Adrian Tsang | Centre de génomique structurale et fonctionnelle, Université Concordia, Montréal (Québec)

Au cours du dernier siècle, la croissance économique des pays industrialisés a été subordonnée à l'utilisation des combustibles fossiles et des produits chimiques. Cependant, ce type d'économie ne peut se maintenir à perpétuité; les combustibles fossiles sont des ressources non renouvelables, et l'utilisation à grande échelle de produits chimiques est associée à la détérioration de l'environnement et de la santé humaine. Nombre de pays industrialisés se tournent maintenant vers des économies fondées sur les ressources renouvelables et les bioprocédés. Dans un pays riche en ressources naturelles comme le Canada, le passage à une telle économie pourrait se traduire par une expansion économique, une augmentation de la compétitivité, un environnement plus propre, une plus grande sécurité énergétique et une plus grande cohésion sociale des collectivités rurales.

Il y a à peu près une centaine d'années, la bioéconomie, c'est-à-dire une économie fondée sur les ressources biologiques renouvelables, était la norme. Dans ces sociétés de l'ère préindustrielle, la plupart des gens luttaient juste pour survivre, et seule une poignée de personnes pouvait se permettre d'avoir un niveau de vie élevé. Par conséquent, le retour à une bioéconomie qui ne serait pas associée aux progrès technologiques a peu de chances de permettre de concrétiser les principes fondamentaux du développement durable, c'est-à-dire la croissance économique, la protection de l'environnement et le développement social. Dans son plan stratégique de développement durable, le gouvernement du Canada préconise l'utilisation de la biocatalyse,[1] de la fermentation et de la technologie verte pour transformer des bioressources renouvelables de base comme des végétaux (cultures, arbres, algues), des animaux, du poisson, des microbes et des résidus organiques (provenant des municipalités, de l'industrie, de l'agriculture, des forêts et de l'aquaculture). Ces matières premières peuvent servir à fabriquer des bioproduits industriels, comme les biocombustibles, la bioénergie, les produits biochimiques, les bioplastiques, les biosolvants et les biosurfactants.[2] La biotechnologie et la génomique sont deux des technologies essentielles requises pour faciliter la mise au point de bioprocédés.

La recherche décrite dans cette communication a été menée par une équipe de chercheurs issus de quatre établissements de recherche du Grand Montréal, soit l'Université Concordia, l'Institut national de la recherche scientifique (INRS)–Institut Armand-Frappier, l'Institut canadien de recherches sur les pâtes et papiers et l'Institut de recherche en biotechnologie du Conseil national de recherches du Canada. Le projet de recherche, financé par Génome Canada et Génome Québec, fait appel à des approches biotechnologiques et génomiques pour identifier des enzymes fongiques qu'on pourrait mettre à profit dans des applications industrielles et environnementales. Je vais donc exposer comment les enzymes peuvent être utilisées pour transformer des produits forestiers conventionnels et convertir des résidus forestiers en de nouveaux produits. Je passerai également en revue les efforts que nous avons déployés pour trouver des enzymes qui présentent un potentiel pour ces applications.

Utilisation de bioprocédés

Les bioprocédés sont généralement considérés comme moins polluants mais plus coûteux que les procédés chimiques. Or, l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE), dans le cadre de plus de 20 études de cas portant sur l'évaluation du cycle de vie, a montré que les bioprocédés produisent invariablement moins de déchets et consomment moins d'énergie que les procédés chimiques. Une fois les bioprocédés établis, il est possible d'améliorer rapidement leur efficacité pour les rendre moins onéreux que les procédés chimiques (OCDE, 2001). L'étude de cas sur la production d'acrylamide en est un bon exemple et est examinée ci-dessous.

L'acrylamide est un produit chimique très employé dans les laboratoires des sciences de la vie pour séparer par électrophorèse les macromolécules. L'acrylamide a été synthétisé il y a 20 ans en mélangeant de l'acrylonitrile avec de l'acide sulfurique chauffé et du cuivre. Cette méthode chimique a vite été remplacée lorsque des chercheurs ont découvert que l'enzyme nitrile hydratase pouvait catalyser la conversion d'acrylonitrile en acrylamide. Le procédé enzymatique était supérieur à plusieurs égards au procédé chimique (OCDE, 2001) :

	Procédé chimique	**Procédé enzymatique**
Pureté	70–80 %	>99 %
Température de réaction	70 °C	De 4 °C à la temp. ambiante
Consommation d'énergie	1,9 MJ/kg	0,4 MJ/kg
Dégagement de CO_2	1,5 kg/kg	0,3 kg/kg

J'ai également pu déterminer le prix de détail de l'acrylamide au fil des années en consultant les listes de prix des catalogues des fournisseurs. J'ai découvert que deux qualités d'acrylamide étaient vendues sur le marché en 1990 : la qualité « réactif » (pure à plus de 70 %), à 90 $/kg, et la qualité « électrophorèse » (pure à plus de 98 %), à 620 $/kg. En 2004, seule la qualité « électrophorèse » (ou biologie moléculaire) (pure à plus de 99 %) était offerte à un prix de détail de 54 $/kg, et seul le procédé enzymatique était encore utilisé pour produire l'acrylamide. De plus, cet exemple et d'autres cités par l'OCDE montrent que les bioprocédés sont plus propres et plus éconergétique que les procédés chimiques.

1. L'utilisation de systèmes biologiques ou de leurs composantes, par exemple, des enzymes, pour déclencher des réactions chimiques.
2. Composés d'origine microbiologique qui abaissent la tension superficielle entre les autres composés, de façon semblable aux détergents.

Transformation des produits et résidus forestiers

L'industrie des pâtes et papiers emploie quelque 70 000 Canadiens et Canadiennes, et des usines de pâtes sont présentes d'un bout à l'autre du pays dans chaque province. Le Canada est le quatrième plus important producteur de pâtes et papiers au monde mais le plus gros exportateur de ces produits. La contribution de l'industrie des pâtes et papiers à la balance commerciale du Canada est d'environ 17 milliards de dollars.

Pratiquement tous les produits de pâtes et papiers fabriqués au Canada sont faits à partir de bois. La composition du bois, en poids sec, est la suivante : 50 % de cellulose, la principale fibre utilisée dans la fabrication du papier, environ 20 % d'hémicellulose, surtout le xylane, les 30 % restants étant principalement constitués de lignine et de faibles quantités de résines et de lipides. On utilise principalement les procédés mécaniques et chimiques pour fabriquer les pâtes et papiers. Même s'il a été démontré que de nombreuses enzymes sont utiles pour cette transformation (figure 1), seules quelques-unes sont en fait utilisées (Bajpai, 2004). La xylanase, qui est ajoutée lors du blanchiment de la pâte, est l'enzyme la plus utilisée dans l'industrie canadienne du papier; environ 10 % de la pâte est blanchie de cette façon. On ne comprend pas entièrement le mode d'action de la xylanase lors du blanchiment; on pense que la xylanase dégrade le xylane de surface dans le bois, exposant ainsi davantage la lignine aux produits chimiques oxydants (Paice *et al.*, 1992) et réduisant la quantité nécessaire de ces produits chimiques. D'autres enzymes sont utilisées lors du recyclage du papier, mais dans une moindre mesure que la xylanase : ce sont l'amylase pour le désencrage et la cellulase pour la remise en pâte.

Le secteur canadien des transports dépend presque exclusivement du pétrole. Toutefois, les changements climatiques et la réduction prévue des réserves de pétrole ont stimulé la recherche sur les carburants de remplacement. Les États-Unis, le Brésil et certaines provinces canadiennes encouragent fortement le remplacement de l'essence par l'éthanol. Certains automobiles récentes sont conçues pour rouler à l'éthanol E85 — un mélange composé de 85 % d'éthanol et de 15 % d'essence — ou à l'essence. À l'heure actuelle, deux enzymes, soit l'amylase et la glucoamylase, sont utilisées pour décomposer l'amidon en glucose et assurer la fermentation afin de produire l'éthanol-carburant. Le terme « bioéthanol » désigne l'éthanol produit à partir de biomasse comme le bois, les graminées et les déchets organiques (Sheehan et Himmel, 1999). En 2003, la société canadienne Iogen Corporation a construit la première usine pilote au monde de bioéthanol.

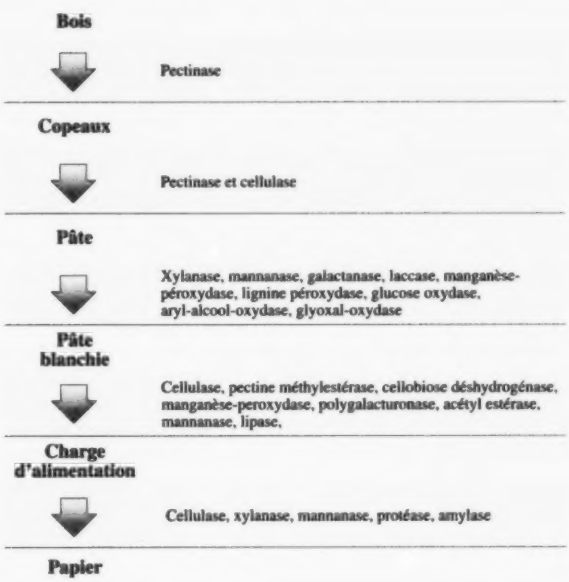


Figure 1. Enzymes servant à la fabrication du papier.

La biomasse servant à produire le bioéthanol se compose principalement de cellulose, suivie d'hémicellulose. Comme je l'ai mentionné précédemment, les enzymes disponibles permettent de bien dégrader l'hémicellulose, mais il est beaucoup plus difficile de transformer la cellulose en glucose. La cellulase est souvent désignée comme l'enzyme qui décompose la cellulose, mais l'activité synergique d'au moins trois enzymes est nécessaire pour la dégrader. L'endoglucanase coupe au milieu des chaînes les polymères de cellulose. L'exoglucanase (également appelée cellobiose hydrolase) attaque les disaccharides en bout de chaîne des polymères de cellulose. Enfin, la bêta-glucosidase coupe la cellobiose en molécules de glucose, une matière première qui fermente très bien pour produire de l'éthanol (Tomme *et al.*, 1995).

Le Canada récolte quelque 1 million d'hectares de forêt par année, qui génère environ 38 millions de tonnes de résidus organiques qui ne sont pas transformés en produits (ACPP, 2001). Si cette quantité de résidus organiques pouvait être transformée par fermentation, elle produirait quelque 5 milliards de L de bioéthanol, soit à peu près 10 % de la consommation d'essence du pays. Selon des estimations du Service canadien des forêts de Ressources naturelles Canada, plus de 21 millions d'hectares de forêt sont endommagés, et la moitié des arbres récoltés sont infestés. Au total, les résidus organiques produits par les activités du secteur canadien des forêts fournissent une quantité amplement suffisante de matière première pouvant être transformée par fermentation en éthanol.

À la recherche d'enzymes fongiques

Les enzymes sont habituellement capables de transformer des substrats simples en produits et d'agir dans des conditions modérées. Cependant, les enzymes actuellement disponibles ne permettent pas de transformer efficacement ou économiquement des substrats complexes comme le bois en de nouveaux produits. De plus, les chercheurs ne comprennent pas entièrement la combinaison d'enzymes nécessaires pour dégrader un substrat si complexe.

Les champignons sont les principaux décomposeurs de la biosphère. Au fil de leur évolution, nombre d'entre eux ont acquis la capacité de dégrader le bois en sécrétant des enzymes extracellulaires qui décomposent la lignocellulose, puis d'assimiler dans leurs cellules les sucres et l'azote ainsi obtenus. On sait que les enzymes sécrétées par les champignons accomplissent des

réactions chimiques des plus complexes et variées. Notre projet de recherche a pour objectif de découvrir de telles enzymes fongiques et d'apprendre à les utiliser pour décomposer la matière ligneuse. Nous voulons également mieux comprendre le mode d'action des champignons dans le bois au niveau moléculaire afin de mieux connaître les complexes enzymatiques nécessaires pour décomposer la lignocellulose.

La figure 2 présente un aperçu de notre projet de recherche. Nous commençons par construire des banques d'ADNc (ADN complémentaire) de champignons, puis nous utilisons les marqueurs de séquences exprimées (séquences d'EST) pour identifier une série de gènes codant pour les protéines sécrétées. Ces gènes cibles sont ensuite clonés dans des vecteurs d'expression, puis insérés dans des organismes, les hôtes d'expression, pour produire des protéines recombinantes dont les caractéristiques biochimiques sont ensuite établies. Ces protéines sont ensuite soumises à des essais pour déterminer si elles peuvent être utiles à des applications industrielles. Les gènes identifiés servent également à construire des biopuces à ADNc pour étudier les profils de transcription. Dans l'espoir d'identifier des enzymes à large spectre d'activité, nous avons entrepris un programme de découverte de gènes portant sur 15 espèces de champignons présentant des profils d'évolution variés. Ces 15 champignons peuvent être répartis dans cinq catégories générales :

(1) champignons ligninolytiques (pourriture blanche) : *Lentinula edodes*, *Phanerochaete chrysosporium* et *Trametes versicolor*;

(2) champignons de dégradation des polluants : *Aureobasidium pullulans*, *Amorphotheca resinae*, *Cunninghamella elegans* et *Leucosporidium scottii*;

(3) champignons de dégradation de la lignine et de la résine : *Aspergillus niger*, *Coprinus cinereus*, *Gloeophyllum trabeum* et *Ophiostoma piliferum*;

(4) champignons tolérants au gel : *Cryptococcus laurentii* et *Geomyces pannorum*; et

(5) champignons composteurs thermophiles : *Thermomyces lanuginosus* et *Sporotrichum thermophile*.

Pour chaque espèce de champignon, nous faisons environ 15 000 réactions de séquençage unique de clones provenant de banques d'ADNc normalisées, à partir de l'extrémité 5′, pour obtenir les

Figure 2. Survol du projet d'identification d'enzymes fongiques de Génome Québec.

séquences d'EST. Ces 15 000 séquences d'EST s'assemblent habituellement en environ 5 000 unigènes. Nous identifions les gènes cibles potentiels à partir de cet ensemble aléatoire de gènes.

Tous les gènes codant pour les protéines sécrétées constituent des cibles potentielles dans le cadre de notre projet de recherche. Les protéines sécrétées par les cellules eucaryotes sont habituellement transloquées dans la lumière du réticulum endoplasmique au moment de leur synthèse. Après une série de repliements et de transformations, elles sont transportées à l'extérieur des cellules par des vésicules de transport. Le tri des protéines sécrétées dans le réticulum endoplasmique est basé sur la reconnaissance d'une séquence signal à l'extrémité N-terminale de la protéine. Nous avons utilisé le programme SignalP (Bendtsen *et al.*, 2004) pour identifier les gènes codant pour les protéines sécrétées. De plus, nous avons utilisé la famille de programmes BLAST et d'autres outils bioinformatiques pour assigner des fonctions putatives à des gènes cibles. Nous avons découvert qu'une moyenne d'environ 4 % des gènes examinés codent en fait pour les protéines sécrétées et nous avons pu assigner une fonction putative à quelque 40 % de ces gènes. Nous ne pouvons actuellement pas établir la fonction des gènes restants à l'aide des outils bioinformatiques. Le tableau 1 résume le nombre de gènes codant pour les principales classes d'enzymes sécrétées chez quatre espèces de champignons examinées.

Tableau 1. Nombre de gènes codant pour quatre grandes classes d'enzymes sécrétées et nombre de gènes dont la fonction n'est pas encore connue chez quatre espèces de champignons.

	Enzymes				
Champignon	Amylase	Cellulase*	Lipase	Peroxydase	Fonction inconnue
Aspergillus niger	6	30	8	0	102
Cunninghamella elegans	0	5	19	0	112
Gloeophyllum trabeum	4	32	12	0	169
Phanerochaete chrysosporium	8	54	12	15	147

*Y compris l'endoglucanase, la cellobiose hydrolase et la bêta-glucosidase.

Les gènes cibles compilés au tableau 1 sont entièrement séquencés à partir des deux extrémités à l'aide d'amorces spécifiques. Ils sont ensuite analysés de façon plus approfondie à la recherche de caractéristiques qui peuvent aider à associer les protéines exprimées à des compartiments cellulaires autres que le réticulum endoplasmique. Suite à leur annotation manuelle, les gènes cibles jugés comme codant pour les protéines sécrétées sont ensuite préparés pour permettre leur expression.

Les régions des gènes cibles, qui codent pour les protéines, sont amplifiées et clonées dans des vecteurs d'expression. Nous utilisons deux hôtes fongiques, l'*Aspergillus niger* et le *Pichia pastoris*, et un hôte bactérien, le *Streptomyces lividans*, pour exprimer les protéines sécrétées. Environ 40 % des gènes codant pour des protéines sécrétées et dont la fonction a été prévue peuvent être exprimés au niveau fonctionnel chez *A. niger*. La plupart de ces derniers gènes peuvent également être exprimés chez l'autre champignon, le *P. pastoris*. De même, la plupart des gènes qui ne peuvent être exprimés au niveau fonctionnel chez *A. niger* ne sont pas non plus produits par le *P. pastoris*. Toutefois, environ 20 % des gènes qui ne peuvent être exprimés chez l'*A. niger* ni chez le *P. pastoris* sont produits à des niveaux détectables par la bactérie *S. lividans*.

Les protéines recombinantes exprimées sont récoltées dans le milieu de culture et concentrées à l'aide de membranes d'exclusion par taille. Nous utilisons des substrats précis pour caractériser des propriétés biochimiques de base des protéines, comme la température optimale, le pH optimal et la thermostabilité. Nous soumettons également les protéines recombinantes à des essais pour déterminer leur utilité dans le cadre de diverses applications industrielles. En collaboration avec des collègues de l'Institut canadien de recherches sur les pâtes et papiers, nous soumettons ces enzymes à des essais pour vérifier leurs propriétés de bioblanchiment et de biopulpage. Nous avons également élaboré des épreuves sur microplaque pour vérifier la capacité des enzymes de dégrader la cellulose insoluble (Xiao *et al.*, 2004). L'un des défis actuels est d'élaborer des protocoles à haut débit pour tester des applications, puisque les mêmes enzymes peuvent s'avérer utiles à des applications dans de nombreux domaines non apparentés.

Les gènes codant pour les protéines intervenant dans un bioprocédé spécifique sont souvent régulés en tandem. Par conséquent, l'examen des profils de transcription des champignons exposés à différents substrats complexes devrait fournir de l'information sur les enzymes nécessaires à la dégradation de ces substrats. De plus, les gènes à fonction inconnue qui sont régulés à la hausse en présence d'un substrat précis sont plus susceptibles de coder pour des protéines qui interviennent dans le catabolisme de ce substrat. Cette dernière information pourrait nous fournir des indices sur les rôles physiologiques des gènes dont les fonctions ne peuvent être prévues à partir de l'analyse des séquences.

À ce jour, nous avons construit des puces à ADNc pour l'*Aspergillus niger*, le *Cunninghamella elegans*, le *Gloeophyllum trabeum* et le *Phanerochaete chrysosporium*. Les profils de transcription que nous avons établis montrent que les gènes intervenant dans l'utilisation des sources de carbone sont fortement régulés. Ainsi, lorsqu'il est cultivé dans le xylose, l'*A. niger* régule à la hausse les gènes codant pour les enzymes qui utilisent le xylose et celles qui dégradent le xylane, une régulation qui peut être 200 fois supérieure.

Conclusions

Nous avons établi les plateformes technologiques et les filières d'analyse pour identifier et exprimer les enzymes fongiques qui pourraient servir à remplacer les produits chimiques et les procédés mécaniques utilisés lors de la fabrication de la pâte et du papier. Certaines des enzymes identifiées pourraient également être applicables à la conversion des résidus forestiers en carburants. Un grand défi consiste à mettre en place des protocoles d'application permettant de tester un grand nombre d'enzymes. Nous prévoyons instaurer des partenariats avec le secteur privé et le secteur public dans le but d'élaborer de nouvelles applications.

Remerciements

Ces travaux ont été financés par Génome Canada, Génome Québec et une subvention de projet stratégique du Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada.

Bibliographie

ACPP (Association canadienne des pâtes et papiers) 2001. Revue annuelle 2000. ACPP (maintenant appelée Association des produits forestiers du Canada), Ottawa (Ontario). 16 p.

Bajpai, P. 2004. Biological bleaching of chemical pulps. Crit. Rev. Biotechnol. 24:1–58.

Bendtsen, J.D.; Nielsen, H.; von Heijne, G.; Brunak, S. 2004. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. J. Mol. Biol. 340:783–795.

OCDE (Organisation de coopération et de développement économiques). 2001. Les biotechnologies au service de la durabilité industrielle. Service des publications de l'OCDE, Paris (France). 164 p.

Paice, M.G.; Gurnagul, N.; Page, D.H.; Jurasek, L. 1992. Mechanism of hemicellulose-directed prebleaching of kraft pulps. Enzyme Microb. Technol. 14:272–276.

Sheehan, J; Himmel, M. 1999. Enzymes, energy, and the environment: a strategic perspective on the U.S. Department of Energy's Research and Development Activities for Bioethanol. Biotechnol. Prog. 15:817–827.

Tomme, P.; Warren, R.A.J.; Gilkes, N.R. 1995. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. Adv. Microb. Physiol. 37:1–81.

Xiao, Z.; Storms, R.; Tsang, A. 2004. Microplate-based filter paper assay to measure total cellulase activity. Biotechnol. Bioeng. 88:832–837.

Génomique structurale et fonctionnelle des champignons de la maladie hollandaise de l'orme

Louis Bernier | Centre d'étude de la forêt, Université Laval, Québec (Québec)

Avant de vous décrire la recherche en génomique menée par mon équipe, permettez-moi un bref détour dans le temps. Durant la séance de discussion de la première journée du Symposium, quelqu'un a demandé d'où venait le nom de maladie hollandaise de l'orme. Les Hollandais étaient-ils coupables? « Bien au contraire », ai-je répondu. Cette maladie a été ainsi nommée en hommage aux sept chercheures des Pays-Bas qui, à partir de 1919, ont été les premières à mener des études scientifiques sur cette maladie des ormes qui, à cette époque venait d'être introduite dans le Nord-Ouest de l'Europe. Fortes de l'appui de Johanna WesterJijk, qui a dirigé pendant plus de 40 ans le Willie Commelin Scholten Phytopathological Laboratory, ces scientifiques ont non seulement fait la preuve que la maladie était causée par un champignon, mais elles ont également entrepris un programme efficace de sélection pour améliorer la résistance des ormes (Holmes et Heybroek, 1990).

Composantes de la maladie hollandaise de l'orme

La maladie hollandaise de l'orme (MHO) est un flétrissement vasculaire qui peut provoquer la mort d'un orme mûr en l'espace de quelques semaines. Depuis la fin de la Première Guerre mondiale, deux pandémies successives ont décimé les populations d'ormes de l'Europe et de l'Amérique du Nord. Par conséquent, le paysage de certains milieux ruraux et urbains a changé du tout au tout dans ces parties du monde. Ainsi, il y a un siècle, une rue typique de l'Est de l'Amérique du Nord était bordée d'ormes d'Amérique (*Ulmus americana*). En effet, l'orme était devenu une essence ornementale très populaire en raison de sa forme caractéristique de parasol et de sa grande résistance à diverses agressions abiotiques. Toutefois, après le passage de la maladie, des milliers de rues dans des centaines de villes nord-américaines grandes et petites ont été dépouillées de leurs ormes.

Comme on pouvait s'y attendre, la nécessité de trouver des mesures de lutte efficaces et durables contre la MHO a grandement stimulé l'étude des diverses composantes de la maladie. En outre, l'étude de la MHO comporte plusieurs aspects très intéressants pour les phytopathologistes. Cette maladie constitue un bon modèle pour l'étude des flétrissures chez les arbres et un exemple spectaculaire des effets que peuvent avoir des pathogènes exotiques sur des populations d'arbres indigènes. Les agents de la MHO sont faciles à manipuler en laboratoire et se prêtent très bien à des manipulations génétiques — ce qui n'est pas toujours le cas des pathogènes des essences forestières. De plus, des épreuves biologiques relativement simples peuvent être effectuées pour comprendre l'évolution de la maladie. Ainsi, on peut injecter des spores du champignon de la MHO directement dans le xylème de gaules d'ormes pour vérifier leur pathogénicité. Après quelques semaines, on peut observer et quantifier les symptômes externes typiques de la maladie, c'est-à-dire la flétrissure des feuilles. Enfin, on trouve une abondante documentation sur cette maladie et ses agents pathogènes (voir Gil *et al.* [2004] pour un examen récent).

Les pathogènes de la MHO sont des champignons ascomycètes qui appartiennent plus précisément à un groupe connu sous le nom de champignons ophiostomatoïdes. Pendant de nombreuses années, on a pensé que la maladie était causée par une seule espèce de champignon, le *Ceratocystis ulmi*. De nos jours, trois espèces différentes sont connues pour causer la maladie hollandaise de l'orme et ont été reclassées dans le genre *Ophiostoma*. Fait intéressant, l'espèce à l'origine de la première pandémie, survenue peu de temps après la Première Guerre mondiale, c'est-à-dire l'*Ophiostoma ulmi*, est maintenant en voie de disparition. Elle a été supplantée par l'*O. novo-ulmi*, l'agent responsable de l'actuelle pandémie en Europe et en Amérique du Nord. En comparaison d'*O. ulmi*, l'*O. novo-ulmi* est plus agressif et affiche une plus grande valeur adaptative (Brasier, 1991). Au milieu des années 1990, Brasier et Mehrotra (1995) ont décrit une troisième espèce, l'*O. himal-ulmi*, une espèce endémique de la région de l'Himalaya. Même si l'*O. himal-ulmi* ne provoque pas de flétrissement chez les ormes poussant dans cette région, des inoculations d'essences européennes d'ormes, effectuées dans des conditions contrôlées, montrent que ce champignon est extrêmement agressif. Par conséquent, si l'*O. himal-ulmi* était introduit accidentellement en Europe ou en Amérique du Nord, il risquerait d'empirer une situation déjà difficile.

Comme la plupart des champignons ophiostomatoïdes, les pathogènes de la MHO sont transmis par des insectes, dans le cas présent, les scolytes de l'orme. Le scolyte n'est pas en lui-même un grand problème. Les scolytes indigènes coexistent avec les ormes depuis des milliers d'années et ne causent pas beaucoup de dommages. Malheureusement, la situation a changé du tout au tout lorsque les pathogènes de la MHO ont fait leur apparition dans l'Ouest de l'Europe, puis en Amérique du Nord. Les spores des agents pathogènes sont incluses dans un mucilage collant qui leur permet d'adhérer facilement à l'exosquelette des scolytes qui entrent en contact avec elles. Lorsque les scolytes s'alimentent à l'aisselle des rameaux dans la cime d'ormes en santé, ils injectent dans le système vasculaire de l'arbre ces spores grâce auxquelles le champignon prolifèrera et finira par tuer l'arbre (Lanier et Peacock, 1981).

Adrian Tsang, lors de son exposé dans le cadre du présent symposium, a décrit les différentes espèces de champignon qu'il étudiait, y compris l'*Ophiostoma piliferum*, un champignon causant une coloration de l'aubier. Ce dernier est étroitement apparenté aux champignons de la MHO. Toutefois, les champignons provoquant une coloration de l'aubier sont habituellement des saprophytes, c'est-à-dire qu'ils colonisent le bois sans le dégrader ou en modifier les propriétés structurales. Toutefois, comme ils synthétisent de grandes quantités de mélanine, ils provoquent une coloration du bois qui constitue un problème

pour l'industrie des produits forestiers. La plupart des champignons de coloration appartiennent aux genres *Ophiostoma*, *Ceratocystis* et *Leptographium* (Seifert, 1993).

Des études d'un certain nombre d'espèces d'*Ophiostoma* ont montré que ces champignons sont des organismes haploïdes; leur génome nucléaire contiendrait entre 30 et 40 millions de paires de base (Dewar et Bernier, 1995). Une comparaison avec des espèces filamenteuses comme le *Neurospora crassa*, dont tout le génome nucléaire a été séquencé (Galagan *et al.*, 2003), permet d'estimer à environ 8 000 à 10 000 gènes le génome nucléaire d'*Ophiostoma*. Le nombre de chromosome est variable, ce qui n'est pas inhabituel chez les champignons. Il n'est pas non plus surprenant qu'il ait été démontré que la pathogénicité est sous contrôle polygénique chez l'*O. ulmi* et l'*O. novo-ulmi* (Brasier, 1988). Quelques gènes importants des champignons de la MHO ont été cartographiés et/ou clonés, notamment deux gènes de pathogénicité, un gène intervenant dans la pigmentation et un autre codant pour la cérato-ulmine. Cette dernière appartient à un groupe de protéines appelées hydrophobines et a été considérée pendant des années comme le principal facteur de pathogénicité intervenant dans l'interaction orme–*Ophiostoma*. D'après les résultats d'études de mutants nuls[1] d'*Ophiostoma* et de mutants d'*Ophiostoma* surexprimant la cérato-ulmine, cette hydrophobine est un facteur contribuant à la valeur adaptative plutôt qu'un déterminant de la pathogénicité (Bowden *et al.*, 1996; Temple *et al.*, 1997). Il reste encore toutefois beaucoup de recherche à faire puisque les gènes clonés jusqu'à maintenant représentent moins de 0,2 % des gènes nucléaires qu'on pourrait s'attendre à trouver chez ces champignons.

Analyse génomique des pathogènes de la MHO

En 2001, les chercheurs de quatre universités canadiennes se voyaient octroyer par le Programme de projets en génomique du Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) une subvention pour étudier la génomique de deux espèces étroitement apparentées d'*Ophiostoma* : le saprophyte *O. piceae* et le pathogène *O. novo-ulmi*. Mon groupe de l'Université Laval, le groupe de Paul Horgen de la University of Toronto et le groupe de Will Hintz de la University of Victoria ont étudié l'*O. novo-ulmi*, tandis que le groupe de Colette Breuil de la University of British Columbia a effectué des recherches sur l'*O. piceae*. Le présent exposé portera sur les études génomiques d'*O. novo-ulmi*.

L'un des aspects du projet porte sur la génomique structurale. L'électrophorèse sur gel en champ pulsé permet de séparer physiquement et de distinguer les chromosomes individuels chez le genre *Ophiostoma* (Dewar et Bernier, 1995; Dewar *et al.*, 1996, 1997). Chez ces espèces, les caryotypes affichent une grande variabilité. Nous dressons également une carte de liaison à l'égard des champignons de la maladie hollandaise de l'orme. Puisque les chromosomes peuvent être séparés, nous pouvons produire des cartes qui indiquent la localisation physique des marqueurs génétiques sur les chromosomes adéquats d'*Ophiostoma*. Nous avons cartographié à ce jour près de 200 marqueurs nucléaires à partir des résultats d'analyse des descendants de première génération (F_1) d'un croisement dirigé *O. ulmi* × *O. novo-ulmi*.

Notre projet de génomique consistait en gros à obtenir des étiquettes de séquences exprimées (EST). Le désavantage d'une telle approche tient à ce que seule une portion très restreinte du génome est séquencée. Toutefois, compte tenu des fonds limités à notre disposition, cette approche offre une solution de rechange beaucoup moins coûteuse que les grands projets de séquençage visant à identifier le code génétique au complet.

Dans le laboratoire de Will Hintz de la University of Victoria, nous avons séquencé une banque de référence de clones d'ADN complémentaire (ADNc) issus de cultures de la souche *O. novo-ulmi* H327 en phase levuriforme. Nous avons ainsi obtenu près de 6 000 EST, dont 75 % étaient lisibles. Ces dernières comprenaient environ 900 séquences uniques pour lesquelles nous avons trouvé des séquences homologues à fonction connue dans les banques de données publiques — la plupart de ces séquences appartiennent aux classes de fonction métabolique et protéique selon le Munich Information Center for Protein Sequences (http://mips.gsf.de) — et un nombre tout aussi grand de séquences orphelines, c'est-à-dire pour lesquelles les algorithmes de recherche n'ont pu trouver aucun homologue. Un grand nombre des EST restantes d'*O. novo-ulmi* présentait un degré élevé d'homologie avec des séquences dont la fonction est inconnue.

On sait que l'approche EST fournit de moins en moins de résultats à mesure que le séquençage progresse, une lacune à laquelle nous nous sommes heurtés lors de notre projet. En effet, puisque nous en savions très peu sur le génome d'*Ophiostoma*, pratiquement toutes les séquences obtenues en début de séquençage étaient nouvelles. Toutefois, à la fin de l'exercice, nous n'avions pas plus de 30 % de nouvelles séquences par plaque de 96 clones analysés. Une solution à ce problème est de construire des banques d'ADNc provenant d'une culture exposée à des conditions environnementales différentes. Dans le cas présent, nous nous intéressions aux différents stades de développement du pathogène et à sa réaction à la température. L'*O. novo-ulmi* présente un dimorphisme; nous avons donc construit des banques d'ADNc à partir de la forme levure, mycélium, périthèce et parasite. Nous avons également utilisé l'hybridation suppressive soustractive (SSH), une méthode permettant d'enrichir nos échantillons en nouveaux ADNc (Diatchenko *et al.*, 1999). Plus précisément, nous avons obtenu des banques enrichies en SSH à partir de cultures de la souche H327 d'*O. novo-ulmi* exposées à une température soit élevée, soit basse (31 °C ou 15 °C) — qui sont sous-optimales comparativement à la température optimale de 25 °C (Brasier *et al.*, 1981). Nous avons également construit des banques d'expression enrichies des séquences exprimées lors de la formation des synnémas (structures reproductrices asexuées) et des périthèces (structures reproductrices sexuées), ainsi qu'à partir des cals d'ormes préalablement inoculés du champignon.

1. Les mutants nuls présentent une mutation qui élimine totalement la fonction d'un gène, dans le cas présent parce qu'il y a eu délétion physique du gène.

La technique SSH étant exigeante en main-d'œuvre, nous avons évalué si elle en valait la peine. Nous avons comparé les 4 500 EST lisibles issues de notre banque de référence d'*O. novo-ulmi* avec celles de deux petites banques obtenues par la technique SSH — à partir de cultures du champignon à température élevée et lors de la formation des périthèces. Seulement 6 % des séquences étaient communes aux deux banques soustractives, et la technique SSH nous a permis d'obtenir, en moyenne, 65 à 75 % de nouvelles séquences comparativement à la banque de référence.

Je vais maintenant vous décrire brièvement l'étude génomique de la pathogénicité que nous menons actuellement. Avant que ne débute ce projet, nous analysions des clones génomiques[2] pour localiser des gènes présumés de pathogénicité d'*O. novo-ulmi*, comme au locus *Pat1* (Et-Touil *et al.*, 1999). Nous avons également mis au point des méthodes de mutagenèse par insertion (introduction de mutations dans une séquence d'ADN par insertion d'une base ou plus) chez l'*O. novo-ulmi* et récupéré des mutants qui affichaient moins d'agressivité envers les gaules d'orme. Dans certains cas, nous avons pu récupérer des séquences dont nous avons provoqué la mutation.

L'analyse génomique fonctionnelle nous a permis d'examiner les interactions orme–*Ophiostoma* dans un contexte plus large. Nous avons choisi d'utiliser des cals d'orme plutôt que des gaules pour effectuer les épreuves biologiques parce que les cals ne contiennent pas de tissus hautement lignifiés comme les gaules, ce qui permet de récupérer plus facilement l'ADNc. À l'évidence, la colonisation des cals d'orme non différenciés par l'*O. novo-ulmi* diffère du développement de la flétrissure vasculaire dans les vaisseaux du xylème. En revanche, les cals d'orme affichent plusieurs réactions qui s'observent généralement chez des arbres mûrs attaqués par l'*O. novo-ulmi*, comme la production des phytoalexines mansonone (Yang *et al.*, 1989), des composés toxiques non spécifiques. De plus, nous avons découvert que les cals produisaient également des composés phénoliques et de la subérine, une substance également associée à une réaction de défense des ormes mûrs contre l'*O. novo-ulmi*. Les cals se sont donc révélés utiles pour étudier l'interaction orme–*Ophiostoma*. Une banque non soustractive a été construite à partir de cals d'orme chez lesquels nous avions inoculé l'*O. novo-ulmi*. Nous avons constaté qu'ils renfermaient un grand nombre d'EST affichant un degré significatif d'homologie avec les séquences codant pour des protéines connues (surtout des protéines végétales et quelques protéines fongiques), les autres étant des protéines et des orphelines présumées de végétaux. Nous avons ensuite éliminé de cette banque toutes les EST obtenues à partir de cals non inoculés sains ainsi que d'une culture axénique du champignon, c'est-à-dire une culture exempte de tout autre organisme vivant. L'application de cette soustraction double nous a permis d'obtenir un pourcentage plus élevé de séquences fongiques, y compris des séquences connues et des séquences présumées.

2. Clones provenant d'une série de fragments d'ADN chevauchants générés de manière aléatoire et représentant l'ensemble du génome d'un organisme.

L'annotation des EST découvertes dans les banques d'expression d'*O. novo-ulmi* est en cours. À ce jour, nous avons identifié plusieurs séquences d'intérêt. Ainsi, la banque soustractive obtenue à partir des synnémas comprenait des EST ayant des homologues qui codent pour des protéines spécifiques à la formation de conidies, dont les fonctions exactes ne sont pas encore connues. Comme je l'ai mentionné précédemment, la banque soustractive de pathogénicité renfermait des EST affichant un degré élevé d'homologie avec des gènes fongiques codant pour de protéines présumées. Même si cette dernière banque a été enrichie d'EST fongiques, elle renfermait néanmoins plusieurs homologues de gènes connus de résistance chez les végétaux. C'est là une réalisation importante, compte tenu du fait que les fondements moléculaires de la résistance chez les ormes demeurent peu connus. Autre fait intéressant, nous avons récupéré une EST codant pour une transposase dans la banque obtenue à partir de cultures exposées à la basse température (15° C). Des analyses plus approfondies ont confirmé que cette EST représente un transposon de classe II[3] doté d'une caractéristique particulièrement intéressante : un degré élevé de méthylation et une signature typique d'inactivation par RIP (pour repeat-induced point mutations).[4] Des études physiologiques et structurales détaillées de ce transposon et d'autres découverts chez le genre *Ophiostoma* par mon groupe sont en cours.

Nous avons utilisé la réaction en chaîne de la polymérase en temps réel pour étudier l'expression de gènes individuels choisis chez les pathogènes de la MHO (Tadesse *et al.*, 2003). Plus récemment, nous avons entrepris une analyse de jeux ordonnés de macroéchantillons de plus de 640 ADNc récupérés à partir de cals d'orme infectés par l'*O. novo-ulmi*, et les résultats obtenus à ce jour indiquent qu'au moins le tiers des clones analysés sont exprimés de façon différentielle. La construction d'une biopuce d'*Ophiostoma* composée d'au moins 2 000 séquences géniques différentes est actuellement prévue.

Orientations futures

Comme je l'ai mentionné plus tôt, les quatre laboratoires qui ont participé à ce projet n'avaient aucune expérience en génomique et, jusque tout récemment, étudiaient quelques gènes spécifiques, un seul à la fois. Par conséquent, l'analyse des EST représente une nette réorientation de nos stratégies de recherche, et l'exercice a été très instructif. Jusqu'à maintenant, les avantages se sont principalement faits sentir au niveau de l'exploration du génome : même s'il reste à caractériser 65 à 75 % du génome nucléaire d'*O. novo-ulmi*, nous avons identifié plus de 2 000 EST uniques, ce qui est encourageant. Il y a à peine quelques années, seulement une vingtaine de gènes avaient été identifiés chez l'*O. novo-ulmi*. Comme le soulignait un autre participant au présent symposium [Peter Krell], seulement une vingtaine

3. Séquence d'ADN capable de changer de localisation dans le génome d'une cellule; dans le cas d'un transposon de la classe II, le déplacement se fait d'un endroit à un autre dans le génome grâce à une transposase selon un mécanisme de type « couper-coller ».

4. Le RIP est un mécanisme de défense du génome unique aux champignons par lequel les séquences d'ADN dupliquées sont détectées et modifiées par des mutations du couple guanine/cytosine en couple adénine/thymine.

de gènes sont connus chez certains virus : nous en sommes donc à peu près au même point. Chez ces virus, il ne reste cependant qu'environ 130 gènes à découvrir, tandis que chez les champignons de la MHO, il en reste quelque milliers de plus à caractériser.

À l'heure actuelle, notre recherche pâtit du grand nombre d'EST d'*O. novo-ulmi* qui n'ont pas encore de séquences homologues dans les banques de données publiques, même si le génomes de quelques espèces de champignons a été entièrement séquencé. De plus, plusieurs EST d'*O. novo-ulmi* possèdent des homologues dont la fonction demeure inconnue. Toutefois, comme de nouvelles séquences de gènes sont déposées quotidiennement dans les banques, la situation va s'améliorant. Un résultat très intéressant de notre recherche exploratoire est que nous pouvons maintenant planifier des expériences à plus grande échelle pour vérifier les hypothèses à l'égard du rôle des gènes candidats dans la pathogénicité et dans d'autres aspects contribuant à la valeur adaptative chez l'*O. novo-ulmi*, comme le dimorphisme levure-mycélium et la transition du mode saprophyte au mode pathogène. J'ai bien sûr souligné le fait que les champignons de la MHO sont des pathogènes, mais il ne faut pas oublier que ces organismes doivent également survivre comme saprophytes pour parachever leur cycle évolutif.

Dans la foulée de la recherche que je viens de décrire, nous prévoyons utiliser la technologie des biopuces pour effectuer des analyses fonctionnelles à grande échelle d'*O. novo-ulmi*. Nous voulons aussi étudier la génomique de populations de champignons ophiostomatoïdes choisis. Les données sur les EST d'*Ophiostoma* et les séquences obtenues à partir de l'orme que contiennent notre banque de pathogénicité seront déposées dans une banque publique, dans l'espoir de pouvoir ainsi recruter de nouveaux chercheurs intéressés à étudier les espèces d'*Ophiostoma*, les ormes, ou les deux. Nous effectuons une recherche similaire sur une autre espèce de champignon ascomycète, le *Septoria musiva*, qui est un important pathogène des peupliers hybrides (voir, par exemple, Feau *et al.*, 2005). Ce dernier projet tire parti de l'expertise acquise lors de l'étude d'*O. novo-ulmi*, ainsi que du fait que le peuplier est une essence modèle en génomique des arbres. À long terme, nous espérons que les résultats de notre recherche en génomique contribueront à élaborer des stratégies efficaces de lutte contre des maladies des arbres comme la MHO.

Remerciements

J'aimerais remercier les personnes suivantes des différents équipes de recherche participant à ce projet : Mirella Aoun, Guillaume Bouvet, Colette Breuil, Paul de la Bastide, Scott DiGuistini, Josée Dufour, Will E. Hintz, Paul A. Horgen, Volker Jacobi, Seong H. Kim, Kirk Liefso, Josée-Anne Majeau, Mike Pinchback, Karine Plourde, Henry Rogers, Philippe Tanguay, Yohannes Tadesse et Brad Temple. De plus, je désire souligner la collaboration de Ben Koop, de la University of Victoria, qui nous a donné accès à sa plateforme de séquençage, de Francine Tremblay, de l'Université Laval, qui nous a aidé à produire des cals d'orme, et de Danny Rioux, du Centre de foresterie des Laurentides du Service canadien des forêts, qui a participé aux analyses histopathologiques des cals d'orme. Le financement du CRSNG a rendu cette recherche possible.

Bibliographie

Bowden, C.G.; Smalley, E.; Guries, R.P.; Hubbes, M.; Temple, B.; Horgen, P.A. 1996. Lack of association between cerato-ulmin production and virulence in *Ophiostoma novo-ulmi*. Mol. Plant–Microbe Interact. 9:556–564.

Brasier, C.M. 1988. *Ophiostoma ulmi*, cause of Dutch elm disease. Pages 207–223 *in* G.S. Sidhu, ed. Advances in plant pathology. Vol. 5. Academic Press, New York, NY.

Brasier, C.M. 1991. *Ophiostoma novo-ulmi* sp. nov., causative agent of current Dutch elm disease pandemics. Mycopathologia 115:151–161.

Brasier, C.M.; Lea, J.; Rawlings, M.K. 1981. The aggressive and non-aggressive strains of *Ceratocystis ulmi* have different temperature optima for growth. Trans. Br. Mycol. Soc. 76: 213–218.

Brasier, C.M.; Mehrotra, M.D. 1995. *Ophiostoma himal-ulmi* sp. nov., a new species of Dutch elm disease fungus endemic to the Himalayas. Mycol. Res. 99:205–215.

Dewar, K.; Bernier, L. 1995. Inheritance of chromosome-length polymorphisms in *Ophiostoma ulmi* (*sensu lato*). Curr. Genet. 27:541–549.

Dewar, K.; Bernier, L.; Levesque, R.C. 1996. Electrophoretic karyotyping in fungi. Pages 25-60 *in* B. Birren and E. Lai, eds. Nonmammalian genomic analysis: a practical guide. Academic Press, San Diego, CA.

Dewar, K.; Bousquet, J.; Dufour, J.; Bernier, L. 1997. A meiotically reproducible chromosome length polymorphism in the ascomycete fungus *Ophiostoma ulmi* (*sensu lato*). Mol. Gen. Genet. 255:38–44.

Diatchenko, L.; Lukyanov, S.; Lau, Y.F.C.; Siebert, P.D. 1999. Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes. Pages 349-380 *in* S.M. Weissman, ed. Methods in enzymology. Vol. 303: cDNA preparation and characterization. Academic Press, San Diego, CA.

Et-Touil, A.; Brasier, C.M.; Bernier, L. 1999. Localization of a pathogenicity gene in *Ophiostoma novo-ulmi* and evidence that it may be introgressed from *O. ulmi*. Mol. Plant–Microbe Interact.12:6–15.

Feau, N.; Hamelin, R.C.; van de Casteele, C.; Stanosz, G.R.; Bernier, L. 2005. Genetic structure of *Mycosphaerella populorum* (anamorph *Septoria musiva*) populations in north-central and northeastern North America. Phytopathology 95:608–616.

Galagan, J.E.; and 76 others. 2003. The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. Nature 422: 859–868.

Gil, L.; Solla, A.; Ouellette, G.B., eds. 2004. New approaches to elm conservation. Proceedings of the 2nd International Elm Conference, 20–23 May 2003, Valsaín, Spain. Investigación agraria: Sistemas y Recursos Forestales 13:7–272.

Holmes, F.W.; Heybroek, H.M. 1990. Dutch elm disease – the early papers: selected works of seven Dutch women phytopathologists. American Phytopathological Society, St. Paul, MN. 154 p.

Lanier, G.N.; Peacock, J.W. 1981. Vectors of the pathogen. Pages 14–16 *in* R.J. Stipes and R.J. Campana, eds. Compendium of elm diseases. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.

Seifert, K.A. 1993. Sapstain of commercial lumber by species of *Ophiostoma* and *Ceratocystis*. Pages 141–151 *in* M.J. Wingfield, K.A. Seifert, and J.F. Webber, eds. *Ceratocystis* and *Ophiostoma*: Taxonomy, ecology, and pathogenicity. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.

Tadesse, Y.; Bernier, L.; Hintz, W.E.; Horgen, P.A. 2003. Real time RT-PCR quantification and Northern analysis of ceratoulmin (*CU*) gene transcription in different strains of the phytopathogens *Ophiostoma ulmi* and *O. novo ulmi*. Mol. Genet. Genomics 269:789–796.

Temple, B.; Horgen, P.A.; Bernier, L.; Hintz, W.E. 1997. Ceratoulmin, a hydrophobin secreted by the causal agents of Dutch elm disease, is a parasitic fitness factor. Fungal Genet. Biol. 22:39–53.

Yang, D.Q.; Jeng, R.S.; Hubbes, M. 1989. Mansonone accumulation in elm callus induced by elicitors of *Ophiostoma ulmi*, and general properties of elicitors. Can. J. Bot. 67:3490–3497.

Génomique pour le diagnostic et l'identification de gènes cibles chez les pathogènes des arbres

Richard Hamelin | Centre de foresterie des Laurentides, Service canadien des forêts, Ressources naturelles Canada, Québec (Québec)

Deux projets de génomique concernant les champignons pathogènes se déroulent au Centre de foresterie des Laurentides (Service canadien des forêts [SCF], Ressources naturelles Canada). Le premier, qui vise à élaborer une plateforme de diagnostic moléculaire des ravageurs forestiers, est le projet que je dirige. Le second, sous la direction d'Armand Séguin, s'intéresse aux interactions entre les génomes des arbres et de leurs pathogènes. Nous espérons trouver des outils et acquérir les connaissances nécessaires pour empêcher ou à tout le moins atténuer les effets des épidémies de pathogènes, et mieux comprendre l'action réciproque des ensembles de gènes intervenant dans les interactions hôte/pathogène, hôte/non-hôte et compatible/incompatible. L'une des grandes questions à laquelle nous tentons de répondre est la suivante : quels sont les ensembles uniques de gènes exprimés par un champignon qui déterminent la pathogénicité? Par ailleurs, nous cherchons aussi à établir les différences entre les profils d'expression génique des champignons pathogènes, saprophytes et symbiotiques, comme les mycorhizes et les endophytes. Les réponses que nous trouverons à ces questions pourraient nous aider à élaborer de meilleurs outils d'identification et de surveillance des champignons pathogènes et à découvrir des moyens novateurs de prévenir les infections causées par des pathogènes. Ces deux projets s'inscrivent dans la sphère du diagnostic moléculaire et du génie génétique, les deux principales plateformes de génomique financées par le SCF.

La présence de ravageurs exotiques devrait se faire de plus en plus sentir, compte tenu de la croissance des échanges internationaux et de la vulnérabilité de certains écosystèmes. L'absence de coévolution entre les hôtes indigènes et les ravageurs ou pathogènes exotiques crée un déséquilibre écologique. Combinée à un manque de surveillance de la population d'une espèce exotique après son introduction dans un nouvel écosystème, elle peut se solder par des infestations ou des épidémies. Certains des pires désastres survenus dans des écosystèmes forestiers ont été causés par des pathogènes exotiques. La brûlure du châtaignier (causée par le champignon *Endothia parasitica*) a complètement bouleversé l'écosystème jadis dominé par le châtaignier d'Amérique (*Castanea dentata*), un arbre autrefois de grande taille, qui est maintenant une composante rare du sous-étage des forêts du Nord-Est de l'Amérique du Nord. Près d'un siècle après son introduction, la rouille vésiculeuse du pin blanc (causée par le champignon *Cronartium ribicola*) continue de se propager à de nouveaux hôtes et à de nouvelles régions.

Le dernier relevé annuel des maladies des arbres au Canada faisait état de pertes de 52 millions de mètres cubes de bois en raison des maladies. Cependant, l'impact des maladies sur les forêts ne se mesure pas uniquement en termes de dégradation de la valeur du bois sur pied ou de pertes de recettes. Dans les montagnes Rocheuses, des écosystèmes entiers, et fragiles, sont menacés par la propagation de la rouille vésiculeuse du pin blanc et par l'apparition d'un nouvel hybride entre cette rouille exotique et une rouille indigène. Cette maladie menace des essences clés comme le pin flexible (*Pinus flexilis*) et le pin à blanche écorce (*P. albicaulis*) et a causé une mortalité de pratiquement 100 % dans certains peuplements. La disparition de ces essences forestières pourrait avoir des effets sur des espèces animales dont l'alimentation dépend énormément des noix de pin, comme le cassenoix d'Amérique (*Nucifraga columbiana*), l'écureuil roux (*Tamiasciurus hudsonicus*) et l'ours grizzly (*Ursus arctos*).

L'encre des chênes rouges est causée par le champignon *Phytophthora ramorum*, le dernier venu sur la longue liste des redoutables pathogènes étrangers; cette maladie, qui provoque l'apparition de chancres, a été détectée en 1993 en Californie, puis décrite et nommée en 2000. L'encre des chênes rouges peut infecter une large gamme d'essences hôtes, y compris les chênes rouges (genre *Quercus*) et le douglas (*Pseudotsuga menziesii*), mais également plusieurs espèces de plantes horticoles, comme les rhododendrons (genre *Rhododendron*) et les camélias (genre *Camellia*).

Le *Phytophthora ramorum* appartient à une classe de champignons phytopathogènes, les oomycètes, qui ont la réputation d'être mortels. L'un d'eux, le *P. infestans*, est l'agent du mildiou de la pomme de terre qui a provoqué la Grande Famine en Irlande et l'émigration de millions d'Irlandais au 19e siècle. À l'heure actuelle, l'encre des chênes rouges n'est considérée établie en Amérique du Nord que dans deux petites régions forestières de la Californie et de l'Oregon. En 2003, un seul foyer d'infection a été découvert chez des rhododendrons d'une pépinière de la Colombie-Britannique et a été éliminé. Toutefois, la maladie a été réintroduite en 2004 en Colombie-Britannique par des plantes infectées provenant de pépinières californiennes et fait actuellement l'objet de mesures d'éradication.

Le pathogène responsable de l'encre des chênes rouges possède une grande capacité de dissémination et de survie. Il peut produire différents types de spores qui peuvent être disséminées par l'eau ou par le vent ou qui peuvent rester à l'état dormant dans le sol jusqu'à 20 ans durant. Il peut également être dispersé par les bottes de randonneurs ou les pneus.

Le SCF a travaillé en étroite collaboration avec l'Agence canadienne d'inspection des aliments (ACIA) à la mise au point d'épreuves de détection et de surveillance du pathogène de l'encre des chênes rouges. La Division de la protection des végétaux de l'ACIA est chargée d'empêcher la propagation et l'introduction d'organismes nuisibles étrangers envahissants réglementés et, à cette fin, de décréter des quarantaines, d'effectuer des inspections et d'appliquer des mesures d'éradication. Par conséquent, l'ACIA appuie les activités de recherche sur

le pathogène et la mise au point d'outils de relevé et de diagnostic. Le SCF collabore également avec l'Animal and Plant Health Inspection Service–Plant Protection and Quarantine du département américain de l'Agriculture, qui, comme l'ACIA, s'emploie actuellement à valider des épreuves de diagnostic moléculaire. Un certain nombre de provinces canadiennes et d'États américains, ainsi que des pépinières, des propriétaires de forêt privée et le public, se sont montrés vivement intéressés aux outils d'enquête et d'atténuation.

Il est encourageant de voir que les États-Unis se sont rapidement rendus compte de la gravité des répercussions du pathogène de l'encre des chênes rouges. Ils ont affecté un budget annuel de 44 millions de dollars à la lutte contre ce pathogène, une somme qui a été en grande partie consacrée aux activités d'atténuation, de recherche-développement, de diagnostic et de surveillance. Le Joint Genome Institute (JGI) du département américain de l'Énergie a reçu 4 millions de dollars pour séquencer le génome du pathogène de l'encre des chênes rouges et a dévoilé en mai 2004 la séquence complète du génome lors d'une réunion à laquelle j'ai assisté à la Nouvelle-Orléans. Il s'est avéré que la pathogène de l'encre des chênes rouges avait un petit génome, composé de seulement 66 millions de paires de base et de 16 000 gènes prédits, ce qui a rendu le séquençage facile à réaliser, malgré les problèmes de redondance. Selon le JGI, c'est le délai le plus court jamais observé entre la découverte d'un organisme (2000) et le dévoilement de la séquence complète de son génome (2004). Fait intéressant, le *P. infestans* — le champignon responsable de la Grande Famine en Irlande — est une espèce étroitement apparentée à celui de l'encre des chênes rouges, mais a un génome beaucoup plus gros, comptant 256 millions de paires de base.

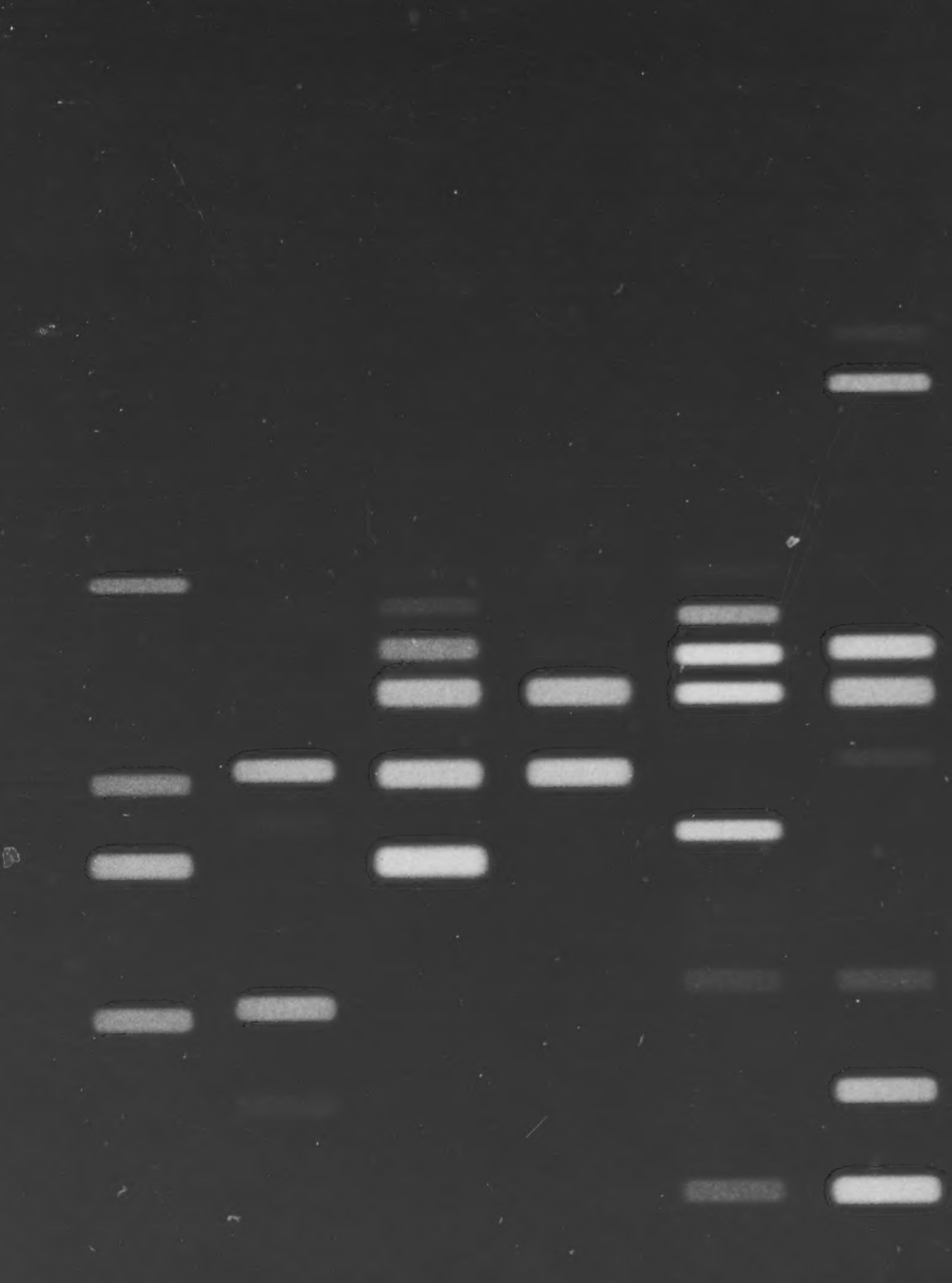
Des applications intéressantes pourraient être dérivées du séquençage du génome du *P. ramorum*. Certains de ses 16 000 gènes doivent intervenir dans la pathogénicité, la sporulation, la reconnaissance de l'hôte et d'autres fonctions du champignon. L'évolution des gènes et du génome sont deux aspects qui m'intéressent. Les gènes peuvent être classés selon qu'ils ont une évolution rapide ou lente et sont alors qualifiés en conséquence. Les gènes rapides sont probablement ceux qui sont soumis à l'un ou l'autre type de sélection naturelle, la sélection balancée ou la sélection positive. La sélection balancée agit pour maintenir les polymorphismes, c'est-à-dire l'occurrence de multiples allèles par locus dans une population, tandis que la sélection positive (ou directionnelle) favorise l'occurrence d'un allèle unique. Les gènes rapides peuvent intervenir, par exemple, dans l'adaptation aux hôtes ou à de nouveaux environnements, dans la reconnaissance de l'hôte ou dans la réaction aux mécanismes de défense de l'hôte. Les scientifiques pourraient cibler ces gènes dans un but de diagnose d'un rang taxinomique plus fin, comme l'espèce, la race, le biotype ou le type sexuel d'un champignon ou encore pour identifier des individus précis. Ils pourraient également les utiliser comme cibles en lutte antiparasitaire en élaborant des composés ou des agents qui interagissent avec des ensembles précis de gènes ou de protéines intervenant dans la pathogénicité ou la reconnaissance de l'hôte.

Les gènes lents hautement conservés font l'objet d'une sélection naturelle purifiante (ou stabilisatrice) qui agit pour éliminer les valeurs extrêmes d'un caractère au sein d'une population, tendant à conférer à cette dernière des caractères communs. Ces gènes sont probablement essentiels à la survie et au développement d'un pathogène ou interviennent dans des processus vitaux essentiels comme la respiration ou le maintien du métabolisme basal. Les scientifiques pourraient utiliser ces gènes en lutte antiparasitaire pour perturber des processus vitaux essentiels. Ils pourraient mettre au point des méthodes antiparasitaires efficaces et polyvalentes en perturbant les fonctions de ces gènes lents. De plus, les gènes hautement conservés se prêtent bien à la diagnose des rangs taxinomiques supérieurs, comme le genre ou la famille. De tels travaux sont particulièrement importants pour faire face aux pathogènes exotiques. En effet, grâce à des sondes moléculaires généralistes qui ciblent un genre complet comme le genre *Phytophthora* — dont toutes les espèces sont phytopathogènes — nous avons de meilleures chances de détecter et d'intercepter un éventuel pathogène exotique *avant* qu'il ne puisse se disséminer dans son nouveau milieu.

Maintenant qu'ils disposent de la séquence complète du génome du *P. ramorum*, les scientifiques peuvent explorer les 16 000 gènes et tenter de déterminer ceux qui évoluent rapidement (sujets à une sélection positive) et ceux qui évoluent lentement (sujets à une sélection purificatrice). Pour y arriver, ils peuvent scruter le génome, puis examiner la distribution des codons et mesurer leur volatilité, c'est-à-dire la fraction des mutations d'un seul nucléotide des codons qui entraîne des modifications de l'acide aminé. Ils peuvent faire ces calculs dans l'ensemble du génome, puis classer chaque gène selon son degré de volatilité.

J'espère que ces approches génomiques nous permettront d'élaborer et d'améliorer des méthodes novatrices de détection, de surveillance et de lutte pour empêcher l'introduction de pathogènes exotiques ou, à tout le moins, atténuer leur dissémination lorsqu'ils auront réussi, malgré toutes les précautions prises, à s'introduire au pays.

DISCUSSIONS



Génomique forestière : priorités futures et questions d'intérêt public

En 2004, la recherche en génomique est arrivée à un tournant important de son histoire au Canada. Le programme fédéral de soutien de la recherche était sur le point d'atteindre la fin de sa première phase, et on s'affairait à préparer les demandes de renouvellement, en tenant compte du rendement passé et des priorités futures. Afin de comprendre la dynamique et les facteurs en jeu et de jalonner les prochaines étapes de la génomique forestière, le comité organisateur de la « Génomique au service des forêts de demain » a jugé que le symposium offrait aux acteurs de la génomique forestière du Canada une tribune idéale pour examiner tous ensemble les priorités futures de la recherche en génomique forestière, notamment en ce qui concerne le Service canadien des forêts (SCF) de Ressources naturelles Canada et Génome Canada. De plus, un deuxième sujet de discussion a été proposé. Il a été demandé aux participants quelles mesures proactives ils prendraient face aux questions environnementales, éthiques, économiques et sociales soulevées par la société à l'égard de la biotechnologie.

Lors de chacune des deux séances de discussion, les participants ont commencé par se réunir en petits groupes, puis ont échangé en plénière. Afin de se préparer aux rencontres et de favoriser une réflexion individuelle, les participants ont reçu une liste de questions destinées à orienter et à stimuler les discussions ainsi qu'un bref aperçu des priorités stratégiques à divers niveaux du gouvernement fédéral (Annexe 1) et une description du programme interne de R-D du SCF en génomique pour 2002–2005 (Annexe 2). Lyle Makowsky, président d'InterQuest Consulting, a agi comme facilitateur.

Voici maintenant un résumé des notes prises sur les tableaux de papier pendant les deux séances de discussion. Elles présentent les principales idées émises par les groupes. Il ne faut pas y voir un compte rendu définitif ou complet des points abordés, mais plutôt les considérer comme le reflet des discussions et des principaux points soulevés.

Séance de discussion 1 : Faire progresser le programme de recherche

Première étape : Cerner les attentes des intervenants

Cette étape visait à examiner les attentes des intervenants définies et formulées par trois groupes qui représentaient respectivement l'industrie forestière, le gouvernement fédéral et la population canadienne. Voici les questions que chaque groupe a explorées.

Selon vous (groupe particulier d'intervenants), quels résultats et quelles répercussions devrait avoir la recherche en génomique forestière?

Quels sont les plus grands besoins de l'industrie ou du secteur des forêts auxquels la recherche en génomique peut répondre?

De quelles priorités stratégiques du gouvernement les chercheurs canadiens en génomique devraient-ils tenir compte?

Quelles sont les applications de la recherche en génomique que la population canadienne pourrait juger bénéfiques et acceptables?

Attentes de l'industrie forestière

- Mieux comprendre le rôle et les avantages de la génomique;
- Fournir la base de connaissances nécessaires à l'élaboration d'outils facilitant les opérations forestières;
- Utiliser la génomique pour maximiser la croissance et la qualité des arbres et l'utilisation de la biomasse ainsi que pour minimiser les pertes causées par les facteurs biotiques et abiotiques, p. ex., améliorer les caractères des arbres cultivés en plantation ou mieux caractériser les arbres à des fins de contrôle de la qualité;
- Fournir des applications à valeur ajoutée qui offrent à l'industrie des avantages à court terme;
- Utiliser la génomique comme outil pour aborder les considérations écologiques et la certification.

Attentes du gouvernement fédéral

- **À court terme**
  - Recherche qui permet d'enrichir les connaissances;
  - Contribution au programme d'innovation, accompagnée d'une augmentation de la propriété intellectuelle débouchant sur des occasions d'affaires;
  - Contribution aux stratégies liées aux changements climatiques, p. ex., outils de diagnostic et de surveillance de la santé des forêts.
- **À moyen terme**
  - Information permettant de prendre des décisions rationnelles à l'appui de la réglementation sur la biotechnologie.
- **À plus long terme**
  - Compétitivité de l'industrie et adoption par l'industrie;
  - Règles du jeu équitables grâce à de meilleurs programmes de recherche;
  - Développement de la bioénergie;
  - Une vision de ce à quoi notre nation forestière doit ressembler, des outils pour développer une nouvelle économie (nouvelles technologies, produits forestiers non ligneux et « chimie verte », dont les avantages ne sont pas encore connus);

- Leadership mondial dans certains créneaux;
- Contribution à l'aménagement durable des forêts;
- Évaluation de l'innocuité pour la population canadienne et des impacts sur les collectivités autochtones;
- Aide pour respecter les engagements internationaux liés aux changements climatiques et aux enjeux internationaux.

Attentes de la population canadienne

- Une recherche en génomique forestière qui soit claire, transparente et compréhensible et qui procure des avantages crédibles et justifiables;
- Une recherche en génomique forestière qui
  - enrichisse les connaissances fondamentales;
  - contribue à la santé des forêts;
  - contribue à la conservation des forêts;
  - améliore la qualité du bois;
  - pousse plus loin le développement de la bioénergie et des produits renouvelables;
  - protège les forêts et le climat;
  - contribue à l'aménagement durable des forêts.

Deuxième étape : Choisir les grandes priorités

Lors de cette étape, les participants ont examiné les attentes des intervenants définies lors de la première étape et ont discuté des priorités de la recherche en génomique qui pourraient le mieux répondre à ces attentes. Les participants ont été divisés en quatre groupes chargés de définir leurs principales priorités en matière de recherche. Voici les questions qu'ils devaient explorer :

> *Vers quels domaines devrions-nous [les chercheurs] faire converger la recherche en génomique forestière au cours des cinq prochaines années?*
>
> *Quelles priorités en matière de recherche répondraient le mieux aux attentes des intervenants?*

Première série de priorités

- Santé des forêts (interaction hôte–ravageur);
- Compréhension de la structure du génome des conifères;
- Qualité du bois;
- Recherche socioéconomique;
- Outils d'expression génétique;
- Recherche sur les ressources génétiques;
- Autres :
  - Séquencer le génome de l'épinette;
  - Établir des liens entre le génome des conifères et celui du peuplier;
  - Utiliser les connaissances acquises grâce au décryptage du génome du peuplier pour aborder les problèmes de durabilité;
  - Établir des protocoles pour la mise au point et la validation de marqueurs.

Deuxième série de priorités

- Approche globale pour comprendre les interactions au sein des écosystèmes forestiers;
- Conservation des espèces;
- Utilisation accrue de l'amélioration génétique en aménagement des forêts;
- Outils de lutte contre les espèces envahissantes, p. ex., de détection et de répression;
- Protection des forêts contre les insectes et les maladies;
- Produits à valeur ajoutée et conversion de la biomasse.

Troisième série de priorités

- Compréhension des réactions des arbres aux insectes et aux maladies;
- Élaboration de stratégies de dissémination et de règlements gouvernementaux propices à l'innovation;
- Découverte des gènes de base : qualité du bois, résistance aux ravageurs, produits commerciaux, pharmaceutiques et nutraceutiques;
- Stratégies de communications;
- Comparaison du génome du peuplier et des conifères.

Quatrième série de priorités

- Qualité des produits forestiers et utilisation efficace de ces produits;
- Protection des forêts;
- Santé des forêts;
- Comparaison du génome des arbres et des ravageurs.

Priorités communes à toutes ces séries

- Santé des forêts (interaction hôte–ravageur, tant les espèces indigènes qu'exotiques);
- Outils de génomique pour les conifères; comprendre la structure du génome des conifères;
- Mesures de lutte et de protection contre les insectes et les maladies;
- Outils de lutte contre les espèces envahissantes, p. ex., de détection et de répression;
- Découverte de gènes de base :
  - Caractères spécifiques;
  - Outils d'expression des gènes;
  - Recherche sur les ressources génétiques;
  - Séquençage du génome de l'épinette blanche;

- Génomique comparative :
  - des peupliers et des conifères;
  - des arbres et des ravageurs;
- Recherche socioéconomique;
- Réglementation gouvernementale propice à l'innovation;
- Utilisation efficace des produits forestiers pour obtenir :
  - la compétitivité;
  - la qualité du bois;
  - des produits à valeur ajoutée;
  - des bienfaits pour la santé, p. ex., produits pharmaceutiques et nutraceutiques.

Troisième étape : Comment faire progresser le programme

Lors de cette étape, tous les participants se sont réunis en plénière pour échanger des idées sur la question suivante :

Comment pouvons-nous conjuguer nos efforts pour faire progresser le programme canadien de recherche en génomique forestière?

Suggestions de synergie

- Dans la mesure du possible, viser la colocalisation des scientifiques du SCF et des universités;
- Chercher des outils de communication adaptés aux scientifiques des universités et du gouvernement;
- Regrouper différents types de subventions financières pour mieux les répartir dans des consortiums gouvernements–universités–industrie;
- Reconnaître l'écart financier entre les projets financés par Génome Canada (moyenne de 10 millions de dollars) et par le SCF (moyenne de 300 000 $, y compris les salaires des chercheurs principaux et des techniciens);
- Réunir plus souvent les membres du milieu (rencontres en personne et au sein d'un réseau);
- Chercher des sources de financement pour les petits projets;
- Examiner comment les grands programmes de recherche pourraient fournir des services aux petits projets (certains projets de Génome Canada jouent déjà ce rôle);
- Fournir une formation et des ressources aux petits projets;
- Dresser une liste claire des ressources existantes et de l'endroit où on les a affectées dans le programme de recherche;
- Examiner les questions liées à la propriété intellectuelle;
- Mettre à profit les ressources et l'influence du Conseil national de recherches du Canada, d'Agriculture et Agroalimentaire Canada et d'Environnement Canada et établir des liens avec les provinces;
- Examiner la grande question de la mobilisation de l'ensemble du milieu;
- Se pencher sur les questions liées au financement de contrepartie exigé, les provinces étant, par exemple, parfois incapables de contribuer autant que le gouvernement fédéral.

Séance de discussion 2 : Relever les défis de la recherche

Première étape : Cerner les défis ou les enjeux

Lors de cette étape, il a été demandé aux participants de décrire les défis que doit relever la recherche en génomique forestière sur quatre plans : société et acceptation par le public, adoption par l'industrie, politique gouvernementale sur la recherche et milieu de la recherche. Les participants ont été divisés en quatre groupes de discussion, et chacun devait explorer l'un de ces aspects à l'aide des questions suivantes :

Quels sont les défis ou enjeux que doit affronter la recherche en génomique forestière?

Quels sont les trois à cinq grands défis à surmonter pour poursuivre la recherche et la faire accepter?

Défis d'ordre social/public

- Nécessité d'une stratégie de communication, p. ex. réduction des risques liés aux espèces envahissantes (insectes et maladies) et connaissances de base favorisant notre crédibilité;
- Besoin d'acceptation par le public et d'appui de l'industrie;
- Nécessité d'aborder les préoccupations environnementales, p. ex., conservation de la biodiversité et de l'habitat;
- Capacités et disponibilité de personnes hautement qualifiées et transférabilité à des industries connexes.

Défis liés à l'adoption par l'industrie

- Viabilité économique et adaptation de l'industrie sur le plan de la propriété intellectuelle, du délai de commercialisation des produits (depuis la recherche et le développement), et des contraintes de la réglementation;
- Acceptation par le public et les consommateurs;
- Capacité et volonté d'adopter et de mettre en marché des technologies émergentes;
- Questions de compétitivité;
- Absence, manque de clarté ou chevauchement des politiques.

Défis liés à la politique gouvernementale

- Coordination, gouvernance et communication, notamment entre ministères ayant des vocations connexes;
- Financement;
- Commercialisation et propriété intellectuelle;
- Réglementation concernant les stratégies de dissémination;
- Réduction du bassin d'experts au gouvernement comme ailleurs.

Défis du milieu de la recherche

- Financement de base à long terme des plateformes technologiques;
- Élaboration d'une stratégie à long terme pour conserver les ressources génétiques;
- Libre accès aux grandes installations, aux ressources et aux outils de la génomique;
- Lignes directrices sur la propriété intellectuelle;
- Autres :
  - Combler l'écart entre la recherche en génomique et la foresterie;
  - Former et recruter des employés hautement qualifiés;
  - Assurer les communications entre les intervenants.

Deuxième étape : Relever les défis

Les participants ont utilisé les questions suivantes pour explorer comment les chercheurs en génomique pourraient mobiliser les principaux intervenants pour relever les défis cernés :

Comment pouvons-nous mobiliser les intervenants et le public pour relever ces défis?

Comment pouvons-nous renforcer la capacité et la volonté de notre milieu de relever ces défis?

Population canadienne

Mobiliser la population

- Élaborer des stratégies de communications à l'égard de groupes cibles précis;
- Tenir un symposium annuel de génomique forestière comme outil de promotion;
- Faciliter le débat public;
- Faire participer les hauts fonctionnaires au débat public sur la génomique forestière.

Renforcer la capacité et la volonté de nos chercheurs en génomique forestière

- Faire comprendre l'urgence, p. ex., les pathogènes en foresterie urbaine;
- Gagner l'appui du milieu de l'enseignement pour mieux sensibiliser la population aux ressources forestières et à leurs avantages;
- Investir dans le renforcement des ressources humaines, p. ex., la formation;
- Mettre en évidence les bienfaits sur la qualité de vie;
- Participer à la coopération internationale.

Industrie

Mobiliser l'industrie

- Engager des discussions avec l'industrie, au niveau de la haute direction et des gestionnaires;
- Élaborer un document d'introduction sur la génomique forestière à l'intention de l'industrie et de la population;
- Organiser des projets éducatifs, des échanges et des visites d'établissements.

Renforcer la capacité et la volonté de nos chercheurs en génomique forestière

- Accroître le financement pour stimuler les « efforts dans le milieu »;
- Promouvoir une utilisation et un partage plus efficaces des ressources pour mobiliser l'industrie.

Gouvernement

Mobiliser le gouvernement

- Chercher des moyens de faciliter les communications entre différents intervenants (gouvernement, universités, industrie, organisations non gouvernementales, population) en commençant par élaborer une stratégie et par désigner des leaders;
- Aborder la question de la réglementation concernant les stratégies de dissémination d'arbres transgéniques (réglementation transparente, scientifiquement fondée et tenant compte des risques et des avantages).

Renforcer la capacité et la volonté de nos chercheurs en génomique forestière

- Améliorer la coordination et la gouvernance pour établir des liens entre la génomique, l'industrie forestière et les collectivités;
- Sensibiliser les gens et établir un langage commun.

Milieu de la recherche

Mobiliser le milieu de la recherche

- Mettre l'accent sur le financement et la nécessité d'accroître le budget de la R-D.;
- Lancer une campagne publicitaire qui présente les avantages de la recherche en génomique forestière;
- Démontrer le rendement du capital investi.

Renforcer la capacité et la volonté de nos chercheurs en génomique forestière

- Donner à nos scientifiques une formation en relations publiques;
- Créer un réseau canadien de génomique forestière (commencer par le SCF et Génome Canada) et mettre sur pied une plateforme électronique commune (p. ex. site Web commun).

Conclusion

Les séances de discussion se sont terminées par un bref résumé de la portée et des résultats des deux séances des deux jours. Un grand thème mentionné à maintes reprises est la nécessité d'améliorer la coordination et les communications dans le

milieu de la recherche et de mettre sur pied un réseau à cette fin. Les participants ont recommandé d'aller de l'avant avec la création d'un tel réseau et d'élaborer une approche prospective pour rapprocher les chercheurs.

Annexe 1 : Aperçu des priorités stratégiques de 2004 du gouvernement fédéral

Discours du Trône ouvrant la troisième session de la 37e législature, février 2004

- Renforcer les assises sociales (santé, enfants, personnes handicapées, Canadiennes et Canadiens autochtones et collectivités);
- Bâtir une économie vigoureuse du 21e siècle (p. ex., développement et application de la biotechnologie, de l'écotechnologie, de technologies de l'information et des communications, de technologies de la santé et de la nanotechnologie);
- Positionner le Canada au premier rang de la prochaine grande révolution technologique (p. ex., combler l'écart au chapitre de la commercialisation de la S-T, favoriser le développement régional et rural, le développement durable);
- Proclamer la fierté et l'influence du Canada dans le monde.

Ressources naturelles Canada

- Fournir l'information afin de prendre des décisions éclairées au sujet des ressources naturelles;
- Veiller à fournir des avantages économiques, sociaux et environnementaux durables pour les générations actuelles et futures;
- Élaborer des stratégies pour réduire les répercussions environnementales dans le secteur des ressources naturelles;
- Assurer la stabilité du secteur des ressources naturelles.

Service canadien des forêts

- Atténuer les effets des changements climatiques sur les forêts du Canada;
- Fournir des connaissances scientifiques;
- Encourager le développement durable des forêts du Canada;
- Mettre l'accent sur les forêts urbaines et le développement économique des collectivités rurales;
- Favoriser la compétitivité de l'industrie;
- Positionner le Canada comme pays forestier à l'échelle mondiale.

Stratégie canadienne de la biotechnologie

- Élaborer un nouveau cadre d'intendance appuyé par des programmes novateurs (prévoyance de la réglementation, répercussions à long terme, dialogue avec la population canadienne et coopération internationale);
- Coordonner le système de R-D (axé sur les grappes et les compétences);
- Accélérer la commercialisation (financement et propriété intellectuelle);
- Améliorer l'accès aux marchés internationaux;
- Forger des alliances pour le développement international;
- Améliorer la sécurité mondiale.

Plan stratégique du Service canadien des forêts en matière de biotechnologie

- Fournir la base de connaissances et les technologies pour contribuer à améliorer la productivité des arbres sur des terres choisies :
  - Comprendre les bases fondamentales des systèmes de production et de protection;
  - Mettre au point des technologies de production d'arbres génétiquement améliorés, supérieurs et à croissance rapide;
  - Élaborer des méthodes de protection des forêts écologiquement acceptables.
- Élaborer des stratégies de déploiement sûres et efficaces pour les produits dérivés de la biotechnologie :
  - Se doter de l'expertise scientifique permettant de fournir des conseils visant la sécurité environnementale;
  - Promouvoir un cadre de travail scientifique pour l'établissement de la réglementation et la protection de la propriété intellectuelle;
  - Sensibiliser le public aux avantages et aux coûts de la biotechnologie.
- Favoriser le recours à la biotechnologie forestière :
  - Former des partenariats novateurs avec les clients et créer des mécanismes de transfert technologique;
  - Faire preuve de dynamisme dans la mise en marché des technologies dérivées;
  - Préconiser l'utilisation responsable de la biotechnologie dans les applications forestières.

Annexe 2 : Initiative de R-D du Service canadien des forêts en génomique, 2002–2005

Programme 1 : Systèmes de production et de protection des arbres forestiers

- Génomique structurale, fonctionnelle et comparative des insectes nuisibles et de leurs virus.
- Caractérisation moléculaire et génétique du pathosystème conifère hôte–champignons du pourridié.

Programme 2 : Marqueurs moléculaires pour le diagnostic, la surveillance et la sélection précoce

- Génomique structurale des essences de conifères.

- Plateforme novatrice de diagnostic moléculaire des ravageurs forestiers.

Programme 3 : Production d'arbres génétiquement améliorés

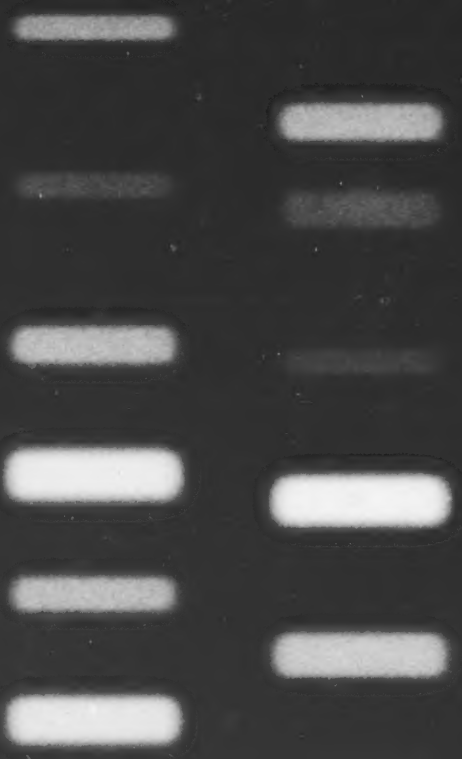
- Résistance du pin blanc au champignon de la rouille vésiculeuse.
- Études des facteurs de transcription contrôlant l'embryogenèse chez l'épinette.
- Création d'une plateforme nationale de génomique fonctionnelle des arbres à l'intention des collaborateurs.

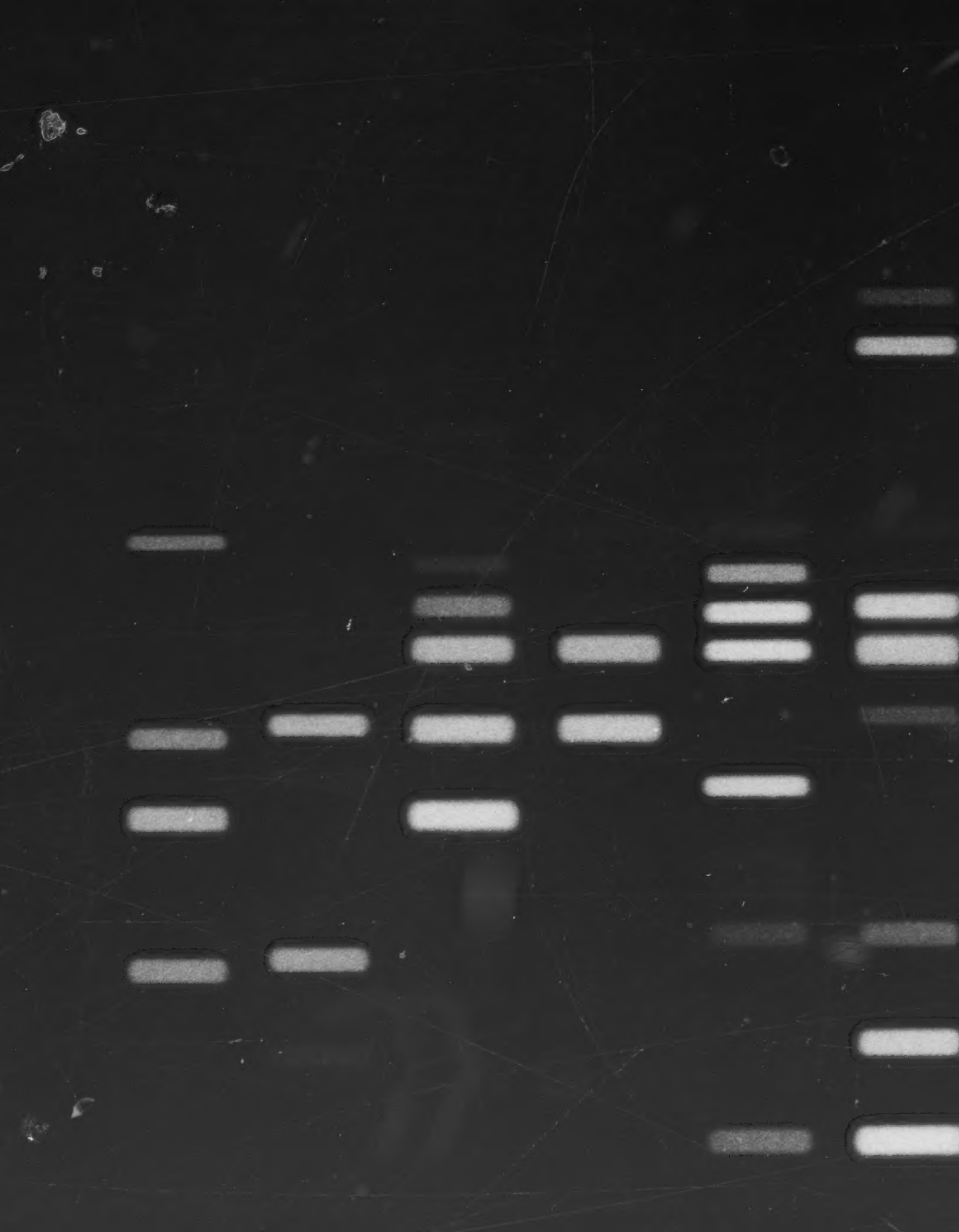
Programme 4 : Élaboration de méthodes de protection des forêts acceptables sur le plan environnemental

- Génomes en interaction dans les mécanismes de défense de l'arbre.
- Outils utilisant l'hormone juvénile pour lutter contre les insectes forestiers nuisibles.
- Génomique fonctionnelle sélective d'insectes ravageurs et de leurs principaux complexes de parasites.
- Modification génétique de virus et d'insectes à des fins d'expression des protéines et de lutte contre les insectes.

GLOSSAIRE

COLLABORATEURS





Glossaire de termes choisis

ADN : acide désoxyribonucléique; macromolécule qui sert de support à l'information génétique du génome de la plupart des organismes vivants; elle se compose de deux chaînes complémentaires de nucléotides enroulées en double hélice et capables de s'autoreproduire. Chez les formes de vie supérieures, l'ADN est regroupé en chromosomes dans le noyau des cellules et est présent sous forme de pelotes dans des organites comme les mitochondries et les chloroplastes. La séquence de nucléotides fournit l'information qui est transmise à la descendance.

ADN complémentaire (ADNc) : brin d'ADN synthétisé à partir d'une matrice d'ARN messager.

ARN : acide ribonucléique; macromolécule présente dans les cellules des organismes, où elle joue un rôle important dans la synthèse des protéines; chez certains organismes, comme certains virus, elle sert de support à l'information génétique.

ARN messager (ARNm) : ARN qui sert de matrice à la synthèse des protéines.

aval, en : qualifie un gène situé après une séquence particulière d'ADN dans la direction de la transcription et de la traduction, c'est-à-dire qui se trouve dans la direction 3′ par rapport à cette séquence particulière.

biopuce : Voir puce à ADN.

cadre ouvert de lecture (ORF, pour open reading frame) : séquence d'ARN ou d'ADN non interrompue par un codon de terminaison (donc dépourvue de triplet signalant la fin d'un message génétique) et codant potentiellement pour une partie ou la totalité d'une protéine. Synonyme : phase ouverte de lecture.

clone génomique : clone obtenu à partir d'un ensemble de fragments chevauchants d'ADN représentant le génome entier d'un organisme.

codon : unité de la séquence d'un gène, formée d'une combinaison de trois nucléotides (triplet) codant pour un acide aminé particulier; un codon est donc à la base de la synthèse des protéines.

commutateur génique : substance chimique qui inhibe ou induit l'expression génique; ainsi, une protéine régulatrice peut être amenée à bloquer ou à déclencher l'expression des gènes qu'elle contrôle.

contig : ensemble de fragments d'ADN clonés chevauchants d'un chromosome particulier; forme abrégée du terme anglais *contiguous sequence*.

élément de réponse : séquence de nucléotides d'un gène qui peut être fixée par une protéine appelée facteur de transcription. En se fixant à un élément de réponse, le facteur de transcription régule la production de protéines spécifiques en inhibant ou en amplifiant la transcription de gènes qui codent pour ces protéines.

embryogenèse somatique : processus de formation de structures embryonnaires organisées, morphologiquement semblables à des embryons zygotiques, mais à partir de cellules somatiques (non zygotiques).

EST : Voir étiquette de séquence exprimée.

étiquette de séquence exprimée (EST) : courte séquence d'ADNc (200–500 paires de bases) issue de l'ARNm provenant d'une population cellulaire spécifique et utilisée pour cloner un grand nombre de gènes exprimés par cette population. Synonyme : marqueur de séquence exprimée.

extrémité cinq prime (5′) et extrémité trois prime (3′) : chacune des deux extrémités d'une chaîne d'acide nucléique; l'extrémité 5′ possède un phosphate, et l'extrémité 3′, un groupe hydroxyle; chez une molécule d'ADN, les deux chaînes d'acide nucléique sont disposées de manière à ce que l'extrémité 3′ de l'une soit alignée avec l'extrémité 5′ de l'autre.

facteurs de transcription : protéines qui régulent l'activité d'autres gènes.

groupe unigène : base de données d'EST contenant une seule copie de chaque séquence unique (voir unigène). Synonyme : collection unigène, jeu unigène.

inactivation d'un gène : stratégie servant à déterminer la fonction d'un gène spécifique en le rendant inactif dans un organisme et en étudiant les conséquences de cette modification.

lecture : chacune des opérations de séquençage effectuées pour déterminer l'ordre des millions de nucléotides d'une molécule donnée d'ADN.

locus quantitatif (QTL, pour quantitative trait locus) : locus polymorphique ou marqueur génétique où la variation allélique est associée à la variation de l'expression d'un trait phénotypique à distribution continue. Synonyme : locus à effets quantitatifs.

polymorphismes d'un seul nucléotide (SNP) : variations survenant lorsqu'un seul nucléotide d'une séquence d'ADN est modifié. Synonyme : polymorphismes nucléotidiques.

puce à ADN : ensemble de molécules microscopiques d'ADN fixées sur un support, comme une petite plaque en verre, une plaquette de silicium ou une autre surface de ce type qui permet une analyse à haut débit des profils d'expression génique.

transcription : synthèse d'une copie d'ARN à partir d'une séquence d'ADN (un gène); première étape de l'expression génique.

unigène : terme dérivé d'UniGene, un système de partitionnement automatique des séquences de la base de données GenBank en différents ensembles non redondants de groupes ou de collections, chaque ensemble regroupant les séquences d'un gène unique ou « unigène ». UniGene est géré par le National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, Bethesda (Maryland).

Collaborateurs

Basil Arif

Centre de foresterie des Grands Lacs
Service canadien des forêts
Ressources naturelles Canada
1219 Queen Street East
Sault Ste. Marie (Ontario) P6A 2E5

Basil Arif est chercheur au Centre de foresterie des Grands Lacs (CFGL) depuis 1972 et a dirigé le projet de Génome Canada sur la biologie moléculaire et le génie génétique des baculovirus et des entomopoxvirus de 2002 à 2004. Il est titulaire d'un doctorat en microbiologie et en immunologie de la Queen's University de Kingston. Au fil des ans M. Arif, outre ses fonctions au CFGL, a occupé divers postes dans d'autres établissements : professeur à temps partiel à l'Université Laurentienne de Sudbury et à la Lake Superior State University du Michigan (1979); chercheur et professeur invité à l'Université de Cologne, en Allemagne (1982–1983); chercheur invité à l'Institut de recherche en biotechnologie du Conseil national de recherches du Canada (Montréal) (1989–1994) et à l'Université de Wageningen (Pays-Bas) (1994–1995); et professeur associé de virologie au Département de microbiologie de la University of Guelph. Grâce à ses activités de recherche conjointe à l'échelon international, M. Arif a été élu au conseil de direction de la Society for Invertebrate Pathology (2001–2005) et il a été membre du groupe d'étude sur les poxvirus du Comité international de taxonomie des virus (2000–2008). Il a également été invité par l'Académie chinoise des sciences à devenir membre du premier conseil consultatif du Laboratoire de virologie des invertébrés, une initiative sino-européenne.

Louis Bernier

Centre d'étude de la forêt
Université Laval
Pavillon Charles-Eugène-Marchand, bureau 2263
Québec (Québec) G1K 7P4

Louis Bernier est professeur au Département des sciences du bois et de la forêt de l'Université Laval. Il a obtenu un doctorat en sciences forestières à la University of Toronto en 1989 et a effectué sa formation postdoctorale en biologie moléculaire à la University of Bath, en Angleterre, de 1988 à 1989. M. Bernier utilise des méthodes génétiques pour étudier les champignons phytopathogènes et leurs interactions avec les arbres forestiers et s'emploie à trouver des applications pratiques à ses résultats de recherche. À l'heure actuelle, il fait des recherches sur la structure et l'évolution du génome de l'*Ophiostoma novo-ulmi*, un champignon pathogène responsable de la maladie hollandaise de l'orme, et étudie les gènes qui modulent la pathogénicité. M. Bernier collabore également à une étude pancanadienne sur des champignons saprophytes à l'origine de taches colorées de l'aubier et participe à la mise au point d'agents de lutte biologique contre ces champignons. M. Bernier est membre du Réseau Biocontrôle du Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada et du Réseau Ligniculture Québec, un organisme de recherche en sylviculture.

Jörg Bohlmann

Michael Smith Laboratories
University of British Columbia
Vancouver (Colombie-Britannique) V6T 1Z4

Jörg Bohlmann est professeur adjoint aux Michael Smith Laboratories de la University of British Columbia (UBC). Il est spécialiste des mécanismes de défense des végétaux contre les insectes, des produits naturels et de la génomique forestière. Il est titulaire d'un doctorat de l'Université technique de Braunschweig, en Allemagne. Lauréat d'une Bourse Alexander von Humboldt, il a complété sa formation postdoctorale de 1995 à 1998 avec Rodney Croteau à l'Institute for Biological Chemistry de la Washington State University. Avant d'accepter ce poste à l'UBC en 2000, M. Bohlmann a travaillé comme chercheur à l'Institut Max Planck d'écologie chimique situé à Iéna, en Allemagne. Outre les mécanismes de défense des végétaux, ses recherches actuelles en génomique portent sur la biochimie des saveurs et des parfums de la vigne. Au nombre des prix et distinctions qu'il a reçus figurent le Distinguished University Scholar Award de l'UBC (2004) et la Bourse commémorative E.W.R. Steacie du Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (2006). M. Bohlmann a à son actif de nombreuses publications dans les domaines de son programme de recherche.

Anne-Christine Bonfils

Direction des sciences et des programmes
Service canadien des forêts
Ressources naturelles Canada
Ottawa (Ontario) K1A 0E4

Anne-Christine Bonfils est coordonnatrice de recherche du Programme de biotechnologie du Service canadien des forêts (SCF) et préside le Comité de gestion de la biotechnologie du SCF. Grâce au rôle qu'elle a joué dans la préparation de documents pour le Cabinet et de présentations au Conseil du Trésor du Canada, le SCF s'est vu allouer de 1998 à 2006 une somme additionnelle de 18,7 millions de dollars pour la recherche en biotechnologie forestière. M^me^ Bonfils a obtenu son doctorat en biotechnologie végétale en 1992, puis a travaillé pendant cinq ans à Agriculture et Agroalimentaire Canada, où elle a participé à l'élaboration et à la mise en œuvre initiale de la régle-

mentation concernant l'évaluation environnementale des végétaux à caractère nouveau en vertu de la *Loi sur les semences*. Elle est entrée au SCF en 1997 en qualité de conseillère scientifique.

Michel Cusson

Centre de foresterie des Laurentides
Service canadien des forêts
Ressources naturelles Canada
1055, rue du P.E.P.S., C.P. 10380, Station Sainte-Foy
Québec (Québec) G1V 4C7

Michel Cusson est chercheur au Centre de foresterie des Laurentides (CFL) et professeur associé au Département de biologie et au Département de biochimie et de microbiologie de l'Université Laval, à Québec. Il a obtenu un doctorat en biologie à l'Université Laval en 1989, puis a poursuivi sa formation postdoctorale en endocrinologie des arthropodes à la University of Toronto de 1989 à 1991. Ses recherches portent sur la physiologie, la biochimie, l'endocrinologie et la virologie des insectes. M. Cusson s'emploie notamment à identifier des protéines qui pourraient être à la base ou être la cible de nouveaux produits de lutte contre des ravageurs forestiers comme la tordeuse des bourgeons de l'épinette. Ses recherches actuelles s'intéressent à la biosynthèse de l'hormone juvénile chez les lépidoptères et aux mécanismes de perturbation du développement des lépidoptères par des polydnavirus.

Abul K.M. Ekramoddoullah

Centre de foresterie du Pacifique
Service canadien des forêts
Ressources naturelles Canada
506 West Burnside Road
Victoria (Colombie-Britannique) V8Z 1M5

Abul Ekramoddoullah est chercheur principal au Centre de foresterie du Pacifique du Service canadien des forêts (SCF). Renommé à l'échelle nationale et internationale pour son apport exceptionnel à la recherche sur les aspects moléculaires de la pathologie forestière, M. Ekramoddoullah est également professeur adjoint à la University of Victoria. Il est titulaire d'un doctorat en immunochimie de l'Université McGill de Montréal et a travaillé dans le milieu universitaire et dans l'industrie avant d'entrer au SCF en 1988. M. Ekramoddoullah estime que c'est grâce à sa formation et à son expérience comme chercheur médical qu'il a pu élaborer des méthodes pour isoler et étudier les protéines intervenant dans les interactions hôte–pathogène chez les conifères. Ses recherches portent également sur l'intégration à des conifères hôtes de gènes codant pour des protéines antifongiques. M. Ekramoddoullah a rédigé et corédigé 90 publications et a été le lauréat de 2004 du Prix pour contribution exceptionnelle à la recherche de la Société canadienne de phytopathologie.

Brian Ellis

Michael Smith Laboratories
University of British Columbia
Vancouver (Colombie-Britannique) V6T 1Z4

Brian Ellis est professeur et directeur adjoint des Michael Smith Laboratories de la University of British Columbia (UBC), professeur à la Faculté des systèmes terrestres et alimentaires de l'UBC et spécialiste du métabolisme des végétaux. Il a obtenu son doctorat en 1969 à l'UBC. Après une formation postdoctorale au Canada et en Allemagne, il accepte un poste de professeur à la University of Guelph où il a également occupé le poste de directeur intérimaire du Centre de biotechnologie végétale de 1986 à 1987. En 1989, il quitte la University of Guelph pour devenir chef du Département de sciences végétales de l'UBC, un poste qu'il a occupé pendant près d'une décennie. Outre ses fonctions professorales et administratives à l'UBC, M. Ellis a été coprésident du groupe d'experts de la Société royale du Canada sur l'avenir de la biotechnologie des aliments (2000–2001). En autres objectifs de recherche, M. Ellis cherche actuellement à découvrir des mécanismes de signalisation grâce auxquels les végétaux détectent les changements environnementaux et y réagissent.

Brian Emmett

Service canadien des forêts
Ressources naturelles Canada
580, rue Booth
Ottawa (Ontario) K1A 0E4

Brian Emmett est sous-ministre adjoint (SMA) du Service canadien des forêts. Il est titulaire d'une maîtrise en économie de la University of Essex, en Angleterre. En 1984, sa carrière d'analyste des politiques dans la Fonction publique fédérale connaît une parenthèse intéressante de deux ans lorsqu'il accepte le poste de sous-secrétaire des Politiques énergétiques et minières du gouvernement de la Papouasie-Nouvelle-Guinée. À son retour au Canada, il a occupé des postes de plus en plus importants au sein du gouvernement fédéral, ayant notamment été en 1991 le SMA du Service des politiques d'Environnement Canada, où il a joué un rôle clé dans la mise en œuvre du Plan vert du Canada. Au fil des ans, il a agi comme porte-parole du Canada en matière d'environnement sur la scène nationale et internationale et a participé à la négociation d'ententes, de protocoles et de conventions variés. En 1996, M. Emmett devient le premier Commissaire à l'environnement et au développement durable du Canada. En 2003, il quitte son poste de vice-président des Politiques à l'Agence canadienne de développement international pour devenir SMA du SCF.

Isabelle Gamache

Direction des sciences et des programmes
Service canadien des forêts
Ressources naturelles Canada
580, rue Booth
Ottawa (Ontario) K1A 0E4

Isabelle Gamache est analyste scientifique en biotechnologie forestière à l'Administration centrale du Service canadien des forêts à Ottawa depuis 2005. Elle a obtenu son doctorat en biologie en 2003 à l'Université Laval, à Québec. M^me^ Gamache a fait partie du Centre d'études nordiques et du Centre de recherche en biologie forestière, au Québec, et a effectué des

études approfondies sur le terrain à la limite nordique de la forêt boréale de 1998 à 1999. En combinant l'écologie forestière et des techniques de génétique des populations, elle a pu étudier l'impact des changements climatiques sur les peuplements subarctiques d'épinette noire à l'échelle de l'écosystème. Au fil des ans, M^me^ Gamache a reçu diverses bourses d'études, notamment du Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) et de la Société géographique royale du Canada. Depuis l'obtention de son diplôme, elle a également travaillé en écologie végétale pour la Chaire de recherche nordique en écologie des perturbations du CRSNG (2004) et comme rédactrice scientifique pour le Centre de recherche et de développement en horticulture d'Agriculture et Agroalimentaire Canada (2005).

Martin Godbout

Génome Canada
150, rue Metcalfe, bureau 2100
Ottawa (Ontario) K2P 1P1

Martin Godbout est Président et Chef de la direction de Génome Canada, un organisme sans but lucratif qui se consacre à la recherche en génomique et en protéomique au Canada. Il a obtenu un baccalauréat en biochimie et un doctorat en physiologie et endocrinologie moléculaire à l'Université Laval, à Québec. De 1985 à 1990, il poursuit ses recherches en neurobiologie moléculaire au Scripps Research Institute, en Californie, grâce une bourse postdoctorale. En 1991, M. Godbout revient à l'Université Laval à titre de professeur adjoint au Département de psychiatrie de la Faculté de médecine, puis devient directeur adjoint responsable des relations avec l'industrie biopharmaceutique au Centre hospitalier de l'université. Avant sa nomination à Génome Canada en 2000, M. Godbout a occupé des postes de direction au sein de la Société Innovatech Québec (1994–1997) et de BioCapital (1997–2000), des sociétés d'investissement axées sur la biotechnologie. M. Godbout a été membre du conseil d'administration du Conseil de la science et de la technologie du Québec (1996–2004) ainsi que de plusieurs sociétés biopharmaceutiques canadiennes, fondations et organisations. Il est l'auteur de nombreuses publications, est souvent invité à présenter des conférences sur des sujets scientifiques et financiers et s'est vu décerner plusieurs prix, y compris le « Grand Prix Recherche » pour ses travaux sur la maladie d'Alzheimer. M. Godbout a été nommé Officier de l'Ordre du Canada en 2005.

Richard Hamelin

Centre de foresterie des Laurentides
Service canadien des forêts
Ressources naturelles Canada
1055, rue du P.E.P.S., C.P. 10380, Station Sainte-Foy
Québec (Québec) G1V 4C7

Richard Hamelin est chercheur en biotechnologie des ravageurs forestiers au Centre de foresterie des Laurentides depuis 1992 et il est professeur associé à l'Université Laval depuis 1994. Il a obtenu un doctorat en biologie à la University of Kentucky (Lexington) en 1991, puis a poursuivi sa formation postdoctorale en pathologie forestière à l'Université Laval de 1991 à 1992 grâce à une bourse du Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada. M. Hamelin utilise des méthodes de génétique des populations pour étudier l'épidémiologie des maladies des arbres. Il participe actuellement à des projets de génomique s'intéressant aux interactions hôte-pathogène et espère utiliser ses connaissances pour trouver des moyens novateurs d'empêcher ou d'atténuer les effets des ravageurs forestiers. Il avait auparavant fait la preuve que la présence de pathogènes exotiques, comme le chancre scléroderrien, résulte de plusieurs introductions distinctes et que les populations de la rouille vésiculeuse du pin blanc de l'Est du Canada sont génétiquement différentes de celles de l'Ouest du pays. Il a également mis au point plusieurs outils de diagnostic moléculaire, y compris des épreuves par réaction en chaîne de la polymérase (PCR) en temps réel ciblant le pathogène de l'encre des chênes rouges, une maladie récemment introduite au Canada.

Peter Krell

Département de biologie moléculaire et cellulaire
University of Guelph
New Science Complex, pièce 4252
Guelph (Ontario) N1G 2W1

Peter Krell est professeur de microbiologie à la University of Guelph. Il a obtenu en 1980 un doctorat de la Dalhousie University d'Halifax pour ses recherches novatrices sur les *Polydnaviridae*, une famille de virus, et a les poursuivies à titre de chercheur à la Texas A&M University, de College Station. En 1981, il revient au Canada à titre de professeur adjoint à la University of Guelph. En 1995, il obtient la bourse de recherche C.T. de Wit en écologie qui l'aide à poursuivre ses recherches à l'Université Wageningen (Pays-Bas) lors d'un congé sabbatique. M. Krell est premier vice-président de la Société canadienne des microbiologistes et il a siégé à nombreux comités, y compris le Comité des bourses du Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG). Il est membre du Réseau Biocontrôle du CRSNG et y occupe le poste de coprésident du programme et de président du Comité d'éducation, de formation et de communications. À l'échelon international, il fait partie du comité de direction de la Society for Invertebrate Pathology et du Comité international de taxonomie des virus. Ses travaux de recherche actuels portent sur la biologie moléculaire des baculovirus des insectes, en particulier sur la transcriptomique et sur les mécanismes de réplication du baculovirus de la tordeuse des bourgeons de l'épinette, le CfMNPV.

Christopher J. Lucarotti

Centre de foresterie de l'Atlantique
Service canadien des forêts
Ressources naturelles Canada
C.P. 4000, rue Regent
Fredericton (Nouveau-Brunswick) E3B 5P7

Christopher Lucarotti est chercheur en pathologie des insectes au Centre de foresterie de l'Atlantique depuis 1989. Il a obtenu un doctorat à l'Université McGill de Montréal en 1981, puis a

poursuivi sa formation postdoctorale à la University of California (Riverside) de 1981 à 1984. M. Lucarotti a siégé à de nombreux comités, y compris les Comités de sélection des subventions de recherche du Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada et, sur le plan international, des comités de la Society for Invertebrate Pathology. Il a également fait partie du comité de rédaction des revues *Canadian Entomologist* et *Journal of Invertebrate Pathology* et du *Journal canadien de botanique*. M. Lucarotti s'emploie à cerner l'impact des pathogènes microbiens d'origine naturelle sur les populations d'insectes ravageurs forestiers. Il a notamment réussi à faire homologuer en 2006 le nucléopolyhédrovirus du diprion du sapin (NeabNPV) comme agent de lutte biologique. M. Lucarotti compte à son actif des publications dans les domaines de l'écologie, de la cytologie et de la biologie cellulaire et moléculaire.

John MacKay

Centre d'étude de la forêt
Université Laval
Pavillon Charles-Eugène-Marchand, bureau 2165
Québec (Québec) G1K 7P4

John MacKay est professeur adjoint au Département des sciences du bois et de la forêt de l'Université Laval et il est le chercheur principal de la phase I d'Arborea, un projet de recherche sur la génomique des arbres financé par Génome Canada et Génome Québec. Il a obtenu un doctorat de la North Carolina State University de Raleigh. M. MacKay élabore des méthodes de génomique fonctionnelle et les utilise pour étudier la formation du bois et la génétique des propriétés du bois chez les arbres forestiers. Durant sa carrière relativement courte, M. MacKay a publié une abondante documentation scientifique dans ce domaine et est souvent invité à prendre la parole lors de conférences et de réunions nationales et internationales. Il codirigera la deuxième phase d'Arborea qui débute en 2006 et poursuivra ses travaux de recherche sur la génomique de la formation du bois chez l'épinette blanche.

Geoff Munro

Direction des sciences et des programmes
Service canadien des forêts
Ressources naturelles Canada
580, rue Booth
Ottawa (Ontario) K1A 0E4

Geoff Munro est Directeur général (DG) de la Direction des sciences et des programmes du Service canadien des forêts (SCF), à Ottawa. M. Munro est titulaire d'un baccalauréat en biologie qu'il a obtenu de la Carleton University, à Ottawa, en 1974. Il a effectué des recherches sur la maladie hollandaise de l'orme en début de carrière, puis s'est consacré à la recherche-développement de produits et de services dans le secteur privé. Pour parfaire ses connaissances, il a suivi une formation scientifique sur les arbres, la nutrition des végétaux et la lutte antiparasitaire au Davey Institute, en Ohio. Durant les années 1980, M. Munro quitte le secteur privé et entreprend une carrière au gouvernement à la Direction des forêts du ministère des Ressources naturelles du Manitoba. En 1989, il se joint au ministère des Richesses naturelles de l'Ontario (MRNO) où, pendant plus d'une décennie, il occupe divers postes et exerce des fonctions de leadership et de direction de programmes liés aux politiques, à la science et aux opérations. En 2001, désireux de faire progresser davantage les enjeux forestiers à l'échelle nationale, M. Munro accepte le poste de DG du Centre de foresterie des Grands Lacs du SCF, puis, en 2004, son poste actuel à l'Administration centrale du SCF. À titre de DG de la Direction des sciences et des programmes, il lui incombe en premier lieu de veiller à ce que la recherche en sciences forestières fournisse les fondements nécessaires à l'élaboration de la politique fédérale concernant le secteur forestier.

Bob Rutledge

Centre de foresterie des Laurentides
Service canadien des forêts
Ressources naturelles Canada
1055, rue du P.E.P.S., C.P. 10380, Station Sainte-Foy
Québec (Québec) G1V 4C7

Bob Rutledge est chercheur au Centre de foresterie des Laurentides (CFL) du Service canadien des forêts (SCF). Il a obtenu son doctorat en génétique moléculaire à la Carleton University d'Ottawa en 1986, puis a participé, grâce à une bourse de recherche postdoctorale, à un projet visant à obtenir par génie génétique une variété de canola résistante aux herbicides au Centre de recherches phytotechniques d'Agriculture Canada. En 1990, M. Rutledge se joint à titre de chercheur au groupe de travail en biotechnologie des conifères à l'Institut forestier national de Petawawa (SCF) et entreprend des travaux sur la fonction des gènes et la génétique du développement chez les conifères. En 1996, le groupe déménage au CFL où M. Rutledge entreprend un projet conjoint visant à élargir l'application des techniques de multiplication à des conifères mûrs dans le but de cloner par embryogenèse somatique des arbres élites. Plus récemment, ses travaux ont pris de l'ampleur et ont été intégrés à un programme plus vaste portant sur l'application de la génomique fonctionnelle et structurale aux conifères.

Armand Séguin

Centre de foresterie des Laurentides
Service canadien des forêts
Ressources naturelles Canada
1055, rue du P.E.P.S., C.P. 10380, Station Sainte-Foy
Québec (Québec) G1V 4C7

Armand Séguin est chercheur au Centre de foresterie des Laurentides (CFL) du Service canadien des forêts depuis 1995. Il a obtenu son doctorat en 1990 à l'Université Laval de Québec, puis a poursuivi sa formation postdoctorale au Salk Institute for Biological Studies en Californie. Depuis, il est devenu un chercheur réputé en biotechnologie des arbres et en génétique moléculaire. Il fait actuellement partie d'une équipe du CFL qui s'emploie à trouver des moyens d'améliorer la résistance des arbres aux ravageurs par le biais du génie génétique ainsi qu'à mieux comprendre la réaction des arbres au stress et aux attaques des ravageurs. M. Séguin occupe également un poste

de professeur adjoint à l'Université Laval et à l'Université de Sherbrooke, où il s'emploie à inciter ses étudiants à utiliser leurs connaissances fondamentales pour trouver des moyens d'améliorer génétiquement les arbres.

Adrian Tsang

Centre de génomique structurale et fonctionnelle
Université Concordia
Complexe des sciences Richard J Renaud
7141, rue Sherbrooke Ouest
Montréal (Québec) H4B 1R6

Adrian Tsang est professeur au Département de biologie de l'Université Concordia depuis 1991. Il a obtenu un doctorat en biochimie en 1978 à la York University de Toronto, puis a poursuivi sa formation postdoctorale grâce à une bourse d'études en sciences de l'Organisation du Traité de l'Atlantique Nord au Imperial Cancer Research Fund à Londres, où il a fait des recherches sur les mécanismes moléculaires du développement. Avant son arrivée à Concordia, M. Tsang a été membre du corps enseignant de la York University et de l'Université McGill. Au fil des ans, il a réorienté ses recherches pour les axer sur la production de protéines chez les champignons, puis sur la génomique des champignons, dans le but d'identifier des enzymes fongiques applicables à des procédés industriels et à la restauration de l'environnement. En 1999, il a été le directeur fondateur du Centre de génomique structurale et fonctionnelle de l'Université Concordia, un établissement de recherche fondamentale en génomique à la fine pointe de la technologie. De 2002 à 2004, M. Tsang a dirigé le projet de Génome Canada intitulé *Approche génomique servant à l'identification d'enzymes fongiques pour les processus industriels et la restauration de l'environnement*, un projet auquel ont participé des chercheurs de l'Université Concordia, de l'Institut de recherche en biotechnologie du Conseil national de recherches, de l'Institut canadien de recherches sur les pâtes et papiers et de l'Institut Armand-Frappier–INRS.